

· 技术研究 ·

原子力显微镜观察丹皮多糖分子的形貌结构及自组装行为

戴玲¹, 廖洪梅¹, 沈业寿¹, 赵帜平¹, 朱晓光²

(1. 安徽大学生命科学学院, 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 安徽合肥 230039;

2. 中国科学院固体物理研究所, 安徽合肥 230031)

摘要: 运用原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM) 技术对丹皮多糖的形貌结构进行研究。采用多糖水溶液液珠滴降法制样, AFM 非接触模式 (non-contact mode) 扫描。AFM 图像显示, 丹皮多糖分子呈现近似球形的结构形貌, 小球形颗粒直径为 50 nm ~ 80 nm 左右, 推测是丹皮多糖的基本结构单位。在一定浓度和条件下, 丹皮多糖分子小球形颗粒可发生聚集, 其中以直径约 170 nm ~ 220 nm 的圈状和中空球聚集体结构较有代表性。将多糖稀溶液 80 °C 加热, 可促进多糖分子发生自组装, 缔合形成长链超分子结构。超分子结构中的每一亚单位亦由小球形颗粒聚集紧缩而成。AFM 图像研究表明丹皮多糖分子在水溶液中倾向采取球状或线团构象并通过链间氢键作用形成分子缔合组装。

关键词: 多糖; 丹皮; 形貌结构; 原子力显微镜; 自组装

中图分类号: O629.12; Q336; Q539

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2007)06-0749-05

Observation of Structure Morphology and Self-assembly of Polysaccharide PSM2b-A by Atomic Force Microscopy

DAI Ling¹, LIAO Hong-mei¹, SHEN Ye-shou¹, ZHAO Zhi-ping¹, ZHU Xiao-guang²

(1. School of Life Science, Anhui Key Laboratory of Eco-engineering & Bio-technique, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China; 2. Institute of Solid State Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China)

Abstract: A complex polysaccharide PSM2b-A, extracted from root cortex of *Paeonia suffruticosa*, was examined by atomic force microscopy. Samples were drop deposited from aqueous solution onto freshly cleaved mica, air dried, and imaged in air using non-contact mode. The images of PSM2b-A had revealed predominantly globular structure with a size from 50 nm to 80 nm in diameter. PSM2b-A also exhibited a circle or hollow sphere structure that was believed to be the associative aggregates of globular particles as evidenced by the 3D images. Measurements showed that circles or hollow spheres had a size about 170 nm ~ 220 nm in external diameter. Interestingly, after incubating diluted solution of PSM2b-A at 80 °C, the molecules were shown to display an extended entangled chain composed of bead-like subunit as visualized in high magnification. Each bead-like subunit was supposed to be condensed state of circles or hollow spheres due to intra- and/or intermolecular interactions. AFM research suggest that PSM2B-A is likely to assume a coiled conformation and easily self-assembly through hydrogen bond intermolecularly.

Key words: polysaccharide; *Paeonia suffruticosa*; morphology; atomic force microscopy; self-assembly

* 收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(03043301); 安徽大学“211工程”学术创新团队资助项目

作者简介: 戴玲(1955—)女, 副教授。研究方向: 糖生物学。(电子信箱) dailing2@ah163.com

从各种生物材料(植物、真菌、海藻等)中提取分离的天然多糖(polysaccharides)及糖复合物,有多种多样的生物功能,如增强免疫、降血糖、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等,其作为一类重要的生物应答调节剂(biological response modifier, BRM)已日益引起人们的兴趣和重视。

对多糖的研究目前多集中在分离、纯化、生物活性研究方面,糖结构的复杂性与多样性使糖的结构研究相对较为滞后。多糖的结构包括一级结构和高级结构,而高级结构由于受到多糖空间结构测试手段的限制,目前研究报道资料较少,还有待于进一步开展工作。

原子力显微镜技术(atomic force microscopy, AFM)作为一种高分辨的结构图像与功能表征手段已成功应用于多种生物大分子的研究,其不仅提供纳米级水平直观的三维结构形貌,还可用于研究分子大小、分子质量分布,分子间的相互作用,分子构象和聚集行为,还可动态记录外界环境改变对生物大分子结构的影响。AFM制样简便,成像不受样品的导电性影响,可在自然的大气或液态下成像,原子力显微镜技术的发展与完善,为多糖的显微结构研究提供了强有力的工具。应用AFM对一些工业上广为应用的多糖类结构进行研究已有不少报道^[1-3]。国内学者对中草药植物多糖的AFM研究也有一些工作^[4-8]。

丹皮多糖是从中药牡丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andr)中提取的天然水溶性多糖复合物,前期研究表明,其具有降血糖、增强免疫、抗衰老等多种生物活性^[9]。本文应用AFM观察丹皮多糖的形貌,为深入了解其空间结构特征,探讨结构与功能的关系提供直观分析资料。

1 材料和方法

1.1 丹皮多糖 PSM2b-A

为本实验室自制。中药牡丹皮原料购自安徽铜陵医药公司,经水浸醇沉法提取分离,并经离子交换柱和凝胶过滤层析柱进一步纯化,样品外观微黄呈蓬松絮状。红外光谱显示有典型的多糖特征吸收峰。间羟基联苯胺法测得糖醛酸含量为17%左右,分子量经FPLC测定为 1.1×10^5 左右。气相色谱分析单糖组成为鼠李糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖,葡萄

糖和半乳糖,摩尔比依次为1.00:0.183:4.30:0.50:1.30:2.41:6.97。PSM2b-A还是一糖复合物,蛋白含量约10%左右^[10]。

1.2 AFM制样

为避免冷冻干燥及复溶过程对多糖形态结构的可能影响,本文采用以sepharose 4B凝胶柱经水洗脱后,分部收集的样品液直接制样。收集液经苯酚-硫酸法测定糖含量,用去离子水稀释至所需浓度,取5 μ L滴于新鲜剥离的云母片表面上,空气自然干燥后,置于干燥皿中过夜,第二天观察(在大气和室温下完成);或将稀释的样品置80 $^{\circ}$ C水浴中保温40 min后,取5 μ L趁热滴于云母片上。

1.3 AFM检测

仪器为Autoprobe CP型多用途SPM(Veeco instrument Co., USA),分析中使用硅探针垂直在硅掺硼材料制成三角形悬臂的前端,悬臂弹性系数为1.6 N/m,悬臂长度为85 μ m,针尖具有各向异性,曲率半径10 nm,图像以非接触模式获得(non-contact mode),共振频率选180 kHz,针尖扫描速率2 Hz,图像数据采集和分析采用该仪器配置的软件(PSI Proscan v1.5)。

2 结果

图1a是采用层析柱水洗脱收集的样品直接滴加在云母表面所获得的AFM图象,可见大量密集分布的球状多糖分子结构,大小不均匀,直径约在几十纳米至几百纳米不等。由于多糖溶液浓度较高,因而所见的多糖分子形貌有很多是大的球状体或团块聚集结构(图1b)。聚集体的形态不太规则,似无规律。若将样品稀释可获得独立散在的单个球形颗粒。

图2a是将样品稀释至1 μ g/mL浓度制样所获得的丹皮多糖AFM图象。图中可观察到有许多圈状和中心带孔的球状结构,平均直径约为170 nm~220 nm左右,圈或孔的内径约60 nm~80 nm。仔细观察,特别是从图2b能清晰地看出丹皮多糖的环状结构和中空球形结构是由若干直径50 nm~80 nm多糖颗粒聚集团绕而成。研究发现,这种圈状和中空的球形结构有较大的概率出现,在作者前期的丹皮多糖透射电镜研究中也获得相似的图象^[11]。说明多糖分子的聚集很有特点,有一定的规律。

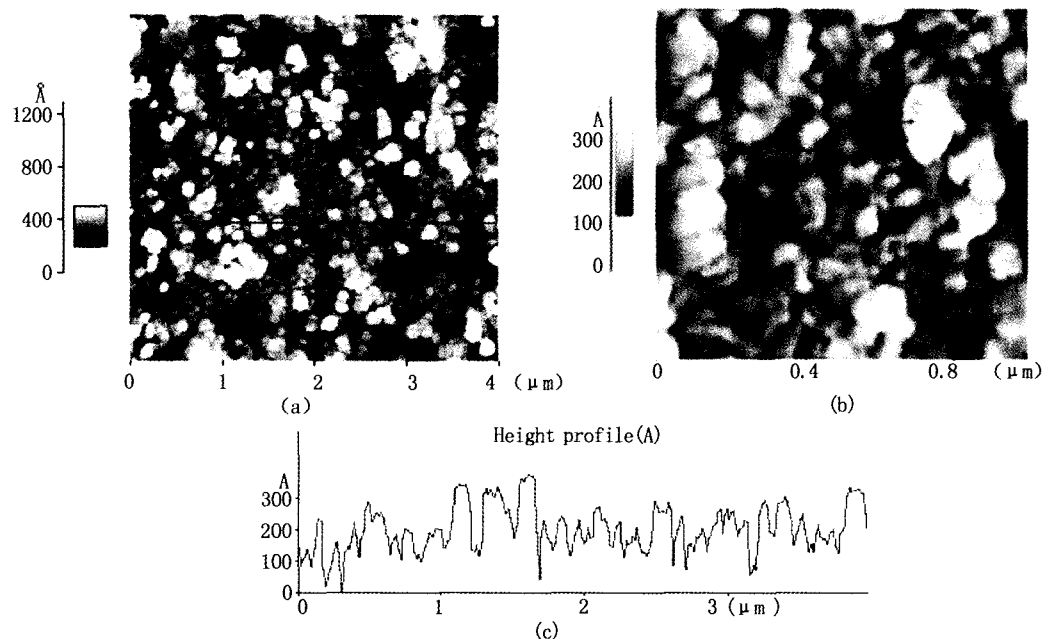


图 1 (a) 丹皮多糖 PSM2b-A 的 AFM 图像;(b) 图 a 中心区的高分辨 AFM 图;(c) 图 a 划线处的高度图

Fig.1 (a) NC-AFM image of polysaccharide of PSM2b-A on mica, (b) High resolution image, (c) Height profile, scan size as indicated in images

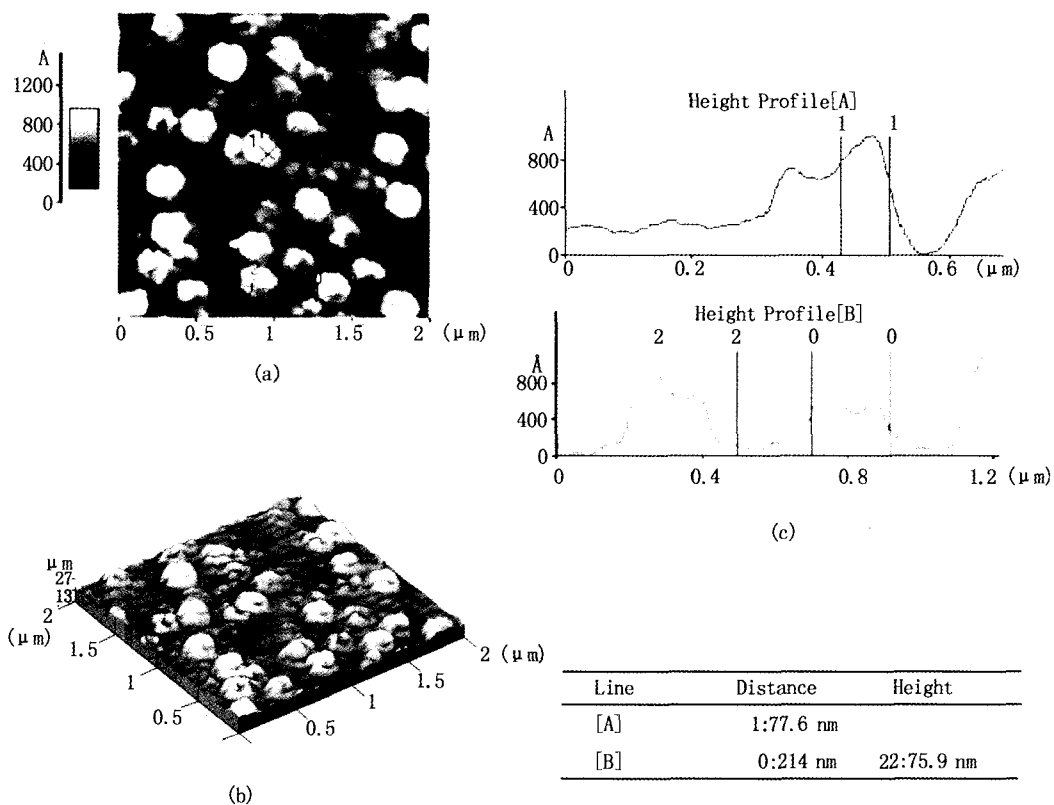


图 2 (a) 丹皮多糖 PSM2b-A 的 AFM 图像;(b) 图 a 的三维图;(c) 图中划线处的高度图,具体数值列于图下方表中

Fig.2 (a) nc-AFM image of polysaccharide of PSM2b-A on mica at a concentration of 1 mg/mL, (b) 3D image of (a), (c) Height profile and the dimensions (in the table beneath the curve)

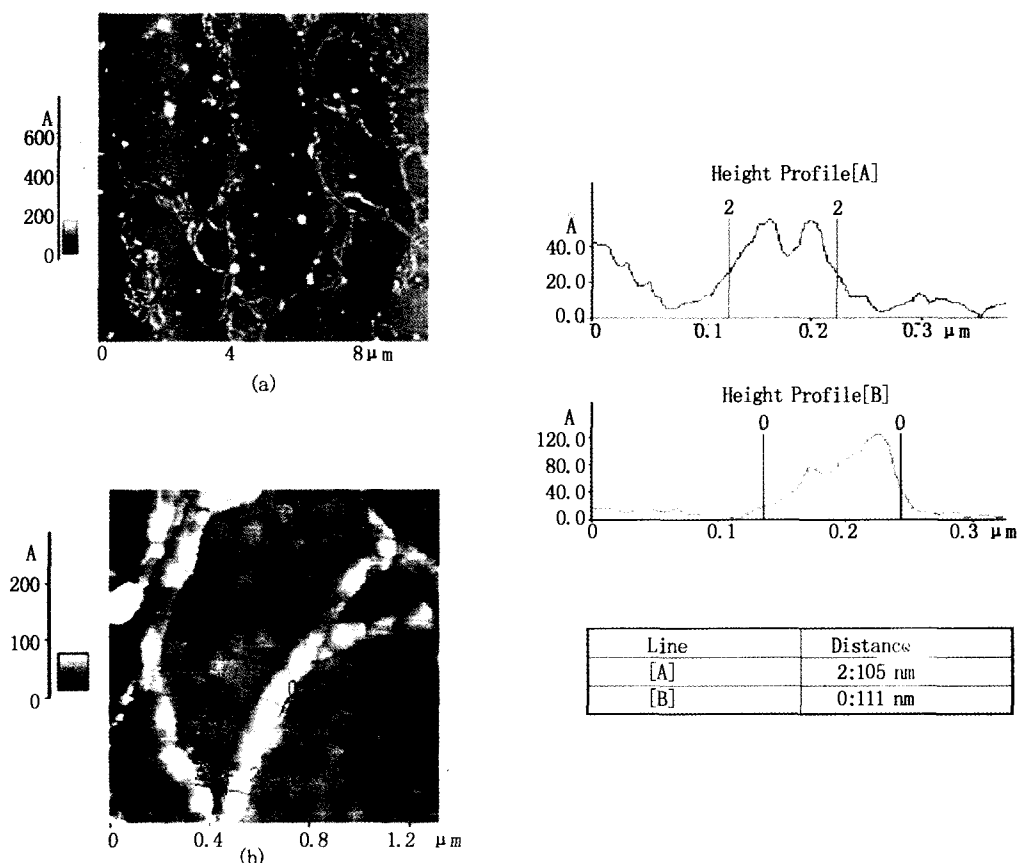


图3 (a)丹皮多糖自缔合形成的自组装结构;(b)为图a局部高分辨扫描图,右侧曲线图为图b中划线处的高度图,具体数值列于下方表中

Fig. 3 (a) nc-AFM images of self-assembly structure of PSM2b-A after heating at 80 °C; (b) High resolution image, the curves on the righthand of the images are the height profile

图3是将丹皮多糖样品稀释至 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后,置 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加温 40 min 后所观察到的图像,可见丹皮多糖分子组装成很长的链,长链折叠、缠绕。这种组装似乎有一定的方向性,更倾向于径向的连接,侧向分支相对较少,因而形成的网格较为稀疏。图3b是图3a局部的高分辨率原子力图像,可以看出长链实际是由多个亚单位连接组装而成的串珠样结构,每个亚单位的直径经统计,平均约为 $100 \text{ nm} \sim 110 \text{ nm}$,各亚单位连接起来,形成长链和网格。

3 讨论

多糖是由糖单元以 α -、 β -糖苷键连接而成的直链或带有分支的线型大分子,其分子链可以卷曲成团或球,也可以伸展成线状,并可缔合形成单股或多股螺旋或棒状,高级结构的形成取决于糖分子的一级结构(链的长度和键接、分支程度、单糖组成等)。同时,AFM观察到的形貌也受到制样方法,载体类

型,溶液浓度、溶剂性质的影响。

丹皮多糖是一水溶性的天然杂多糖,其黏度很小。在本文所研究的条件下,AFM所观察到的丹皮多糖结构形貌近似球形。推测在水溶液中,丹皮多糖单个分子链倾向于转折卷曲,形成较为稳定的球状结构或线团结构。这种结构应是能级最低。由此种球形形貌也可推测丹皮多糖的分子链柔性较大或分枝较多。由于仪器分辨率的限制,球状颗粒内部结构细节还无法分辨。

多糖属多羟基化合物,其游离的羟基易形成氢键,因此多糖链的链内和链间相互缔合的情况很普遍。由于链内氢键的作用,使丹皮多糖分子链折叠卷曲形成的球形结构较为稳定。另外,多糖分子上的游离羟基或带电基团也会和溶剂水分子形成氢键,使糖链分子周围形成一层缔合水,折叠盘绕的分子链内也裹挟了大量的水。水的存在,使样品比较软,因而糖类样品的AFM成像有一定的难度。同时

溶剂化作用也使球状结构中分子链的细节不易观察。

多糖分子链间氢键的作用可使多糖分子发生自缔合。研究还揭示,在一定浓度下,丹皮多糖可通过自缔合聚集组装形成不同尺度水平的分级结构。从丹皮多糖聚集体的结构观察,直径为50 nm~80 nm小球状结构应是其自组装的基本结构单元,由这些小球状结构先聚集形成圈状或中空球状结构,后者通过链间氢键的作用再进一步组装成更高级别的空间结构。环境条件如加温、冷冻干燥、乙醇沉淀、压力、等有可能促进或改变这种组装。本文中对丹皮多糖的稀溶液进行加温,促进了丹皮多糖分子的聚集和组装,形成图3所示的长链结构。从图像观察和尺寸分析,笔者推测长链中的每一个亚单位似由图2中圈状或中空的球状结构连接而成,在连接过程中,圈或中空球同时发生紧缩,形成更致密的结构。可能加温先打断了糖链与溶剂水分子的缔合,热运动促使多糖分子链间的游离羟基有更多的机会形成链间氢键,继而各亚单位缔合。

目前,对多糖高级结构的研究多通过圆二色谱、刚果红结合试验以及粘度、粘弹性、微量差示扫描量热测定等方法来分析推断^[12-14],而通过原子力显微镜则可直接观察分子的立体结构形貌,印证其他表征手段测定的结果。相信随着显微技术的不断进步,会提供更多直观的高分辨力的结构信息。

References

- [1] ABU-LAIL N I, CAMESANO T A. Polysaccharide Properties Probed with Atomic Force Microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2003, 212(3):217-238.
- [2] 王秀艳,董丽松. 原子力显微镜在多糖结构研究中的进展[J]. 高分子通报, 2004, (1):50-56.
WANG Xiu-yan, DONG Li-song. Advances in Study on the Structure of Polysaccharide by Atomic Force Microscopy[J]. Chemistry, 2004, (1):50-56.
- [3] TASKER S, MATTHIJS G, DAVIES M C, et al. Molecular Resolution Imaging of Dextran Monolayers Immobilized on Silica by Atomic Force Microscopy[J]. Langmuir, 1996, 12: 6436-6442.
- [4] 倪得江,陈玉琼,谢笔钧,等. 乌龙茶多糖 OTPS2-1 的光谱特性、形貌特征及热特性研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(12):2 263-2 268.
NI De-Jiang, CHEN Yu-Qiong, XIE Bi-Jun, et al. Spectrum, Morphological and Thermal Characteristics of OTPS-2-1 in Polysaccharides from *Oolong Tea*[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2004, 25(12):2263-2268.
- [5] 石磊,王勇,石勇,等. 虎眼万年青多糖的原子力显微镜观察[J]. 吉林大学学报(医学版), 2003, 29(1): 32-34.
SHI Lei, WANG Yong, SHI Yong, et al. Observation of Polysaccharide from *Ornithogalum caudatum* Ait under Atomic Force Microscope[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2003, 29(1): 32-34.
- [6] 李斌,谢笔钧. 脱乙酰基对天然魔芋葡甘聚糖分子形貌的影响[J]. 功能高分子学报, 2002, 15(4): 447-450.
LI Bin, XIE Bi-jun. Effect of Deacetylate on the Structure Morphology of Natural *Konjac Glucomannan* [J]. Journal of Functional Polymers, 2002, 15(4): 447-450.
- [7] 冯秀俐,白玉白,孙允秀,等. 西洋参多糖(PPQ-d)的原子力显微镜观察[J]. 吉林大学自然科学学报, 2000, (1): 105-106.
MA Xiu-li, BAI Yu-bai, SUN Yun-xiu, et al. Observation of Polysaccharide from *Panax Quinquefolium* L. PPQ-d by Atomic Force Microscopy[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Jilinensis, 2000, (1):105-106.
- [8] 蔡林海,李萍,陆祖宏. 原子力显微镜观察虫草多糖分子的结构形貌[J]. 电子显微学报, 1999, 18(1):103-105.
CAI Lin-tao, LI Ping, LU Zu-hong. Observation of the Structure Morphology of *Cordyceps polysaccharide* by Atomic Force Microscope[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 1999, 18(1):103-105.
- [9] HONG Hao, WANG Qin-mao, ZHAO Zhi-ping, et al. Studies on Antidiabetic Effects of Cortex Moutan Polysaccharide-2h in Type 2 Diabetes Mellitus Rats[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2003, 38(4): 255-259.
- [10] 陈彦,沈业寿,赵帆平,等. 丹皮多糖 PSM2b 的纯化及其理化性质研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(3):237-239.
CHEN Yan, SHEN Ye-shou, ZHAO Zhi-ping, et al. Purification and Physicochemical Properties of Polysaccharides PSM-2B from Moutan Cortex of *Paeonia Suffruticosa* Andr[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2004, 13(3):237-239.
- [11] 戴玲,沈业寿,庄永龙,等. 丹皮多糖分子的电子显微镜观察[J]. 电子显微学报, 2006, 25(5):405-407.
DAI Ling, SHEN Ye-shou, ZHUANG Yong-long, et al. TEM Observation of Polysaccharide from Root of *Paeonia suffruticosa* Andrews[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2006, 25(5):405-407.
- [12] VILLAIN-SIMONNET A, MILAS M, RINAUDO M. A New Bacterial Polysaccharide (YAS34). I. Characterization of the Conformations and Conformational Transition. [J] International Journal of Biological Macromolecules, 2000, 27:65-75.
- [13] ZHANG Xu-feng, ZHANG Li-na, XU Xiao-juan. Morphologies and Conformation Transition of Lentinan in Aqueous NaOH Solution[J]. Biopolymer, 2004, 75: 187.
- [14] BAO X F, DONG Q, FANG J N. Structure and Conformation Behavior of a Glucan from Spores of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst [J]. Prog Biochem Biophys, 2000, 32(6):557-561.