

度的孔洞、沟槽和复杂的图形,最小线宽达 25 nm. 该系统可以很方便地用来加工所需要的任意纳米图形. 同时,实验结果表明我们制得的 Au-Pd 合金膜非常平整并具备优良的机械刻划性能,它可以被用作制备纳米器件的掩膜或直接用于纳米结构的制备.

致谢 本工作为国家“攀登”计划 B(批准号:940211002)资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Nyffenegger R M, Penner R M. Nanometer-scale surface modification using the scanning probe microscope. *Chem Rev*, 1997, 97: 1 195 ~ 1 230
- 2 Matsumoto K, Ishii M, Sagawa K, et al. Room temperature operation of a single electron transistor made by the scanning tunneling microscope nanooxidation process for the  $TiO_x/Ti$  system. *Appl Phys Lett*, 1996, 68(1): 34 ~ 36
- 3 Sohn L L, Willett R L. Fabrication of nanostructures using atomic-force-microscope-based lithography. *Appl Phys Lett*, 1995, 67(11): 1 552 ~ 1 554
- 4 Magno R, Bennett B R. Nanostructure patterns written in ~ semiconductors by an atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 1997, 70(14): 1 855 ~ 1 857
- 5 Mamin H J. Thermal writing using a heated atomic force microscope tip. *Appl Phys Lett*, 1996, 69(3): 433 ~ 435
- 6 Bouchiat V, Esteve D. Lift-off lithography using an atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 1996, 69(20): 3 098 ~ 3 100
- 7 Barrett R C, Quate C F. Large-scale charge storage by scanning capacitance microscopy. *Ultramicroscopy*, 1992, 42 ~ 44: 262 ~ 267
- 8 Tegen S, Kracke B, Damaschke B. Surface modifications with a scanning force microscope. *Rev Sci Instrum*, 1997, 68(3): 1 458 ~ 1 460
- 9 Song Jiaqing, Li Chunzeng, He Huixing, et al. Fabrication of gold nanostructures on graphite using atomic force microscope. *Mol Cryst & Liq Cryst*, 1997, 294 ~ 295: 51 ~ 54
- 10 Song Jiaqing, Liu Zhongfan, Li Chunzeng, et al. SPM-based nanofabrication using a synchronization technique. *Appl Phys A*, 1998, 66: S715 ~ S717
- 11 Xu S, Liu G. Nanometer-scale fabrication by simultaneous nanoshaving and molecular self-assembly. *Langmuir*, 1997, 13(2): 127 ~ 129

(1997-11-24 收稿, 1998-03-24 收修改稿)

## 应用扫描隧道显微镜研究神经丝的结构

刘 洁 佟向军 庞世瑾 翟中和

(中国科学院物理研究所、凝聚态物理中心北京真空物理实验室,北京 100080; 北京大学生命科学学院,北京 100871)

**摘要** 从牛脊髓中分离纯化得到神经丝,应用扫描隧道显微镜对天然神经丝的结构进行了研究. 在扫描隧道显微镜观察中,神经丝呈直径为  $(10.2 \pm 0.8)$  nm 的长杆状结构,有许多长短不一的侧臂从长杆两侧伸出,长、短侧臂相间排列,相邻侧臂的距离为 10 nm 左右. 根据 STM 观察结果,提出了一个新的神经丝的结构模型.

**关键词** 神经丝 中间纤维 扫描隧道显微镜

神经丝(neurofilaments, NFs)是神经细胞的中间纤维,广泛存在于各种动物的成熟神经元

中. 神经丝是典型的 10 nm 纤维,轴突内的神经丝互相平行排列,其间由直径为 4~6 nm,长度为 20~50 nm 的横桥连接<sup>[1]</sup>. 哺乳动物的神经丝由 3 种蛋白组成,其电泳分子量分别为 68 ku(低分子量神经丝蛋白,简称 NF-L),160 ku(中等分子量神经丝蛋白,简称 NF-M)和 200 ku(高分子量神经丝蛋白,简称 NF-H),习惯上称之为神经丝 3 组分(Neurofilaments triplet proteins,简称 NFTP<sub>s</sub>)<sup>[2]</sup>. 神经丝在二级结构上由 3 部分组成:约含 310 个氨基酸的  $\alpha$ -螺旋杆状区、非螺旋的氨基末端和羧基末端. 以往的研究表明,神经丝呈一种灯刷状结构:主体是 10 nm 的核心纤维,从核心纤维上每隔 22 nm 向外伸出 2~4 根丝状突起——侧臂(sidearms)<sup>[3]</sup>. 在体外,由 NF-L 单一组分可组装成核心纤维,但没有侧臂存在;NF-M 和 NF-H 不能单独形成纤维,而需与 NF-L 共同组装,它们的尾部不参与 10 nm 纤维的构建,而是形成侧臂,这些侧臂构成了体内神经丝间的横桥结构<sup>[3]</sup>.

本文应用扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)对神经丝的结构进行了研究,并根据所得到的 STM 图象提出一种新的天然神经丝的结构模型.

## 1 材料与方法

( ) 神经丝的分离纯化. 神经丝取自牛脊髓,分离纯化过程参照 Hisanaga 等人<sup>[3]</sup>的方法. 牛脊髓从大红门屠宰场采得,去除脊膜后,加等体积的 PEM 缓冲液(100 mmol/L pipes, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g/mL Leupeptin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) pH=6.8) 匀浆, 0~4 全速 5 s. 匀浆物在 2 以 28 000  $\times g$  离心 50 min. 收集上清液,加入 20%甘油(体积百分比)混合,37 保温 30 min. 室温下 150 000  $\times g$  离心 90 min,取沉淀溶解于 PEM 缓冲液中,使蛋白浓度大约在 1.0 mg/mL. 分离到的神经丝用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,胶浓度为 7.5%. 以考马斯亮蓝 R-250 染色.

( ) 神经丝的 STM 观察. 将纯化的神经丝溶液用蒸馏水透析,并稀释到 100  $\mu$ g/mL 的蛋白浓度. 取 50  $\mu$ L 稀释液滴于新揭开的高定向石墨(HOPG)表面,在室温下静置 5 min,使蛋白分子自由吸附. 旋转将过剩的液体去除,同时蛋白分子可比较均匀地分布于基底表面. 室温下风干.

用扫描隧道显微镜 CSPM-930a(中国科学院化学研究所制)在大气下进行观察. 采用恒流方式. 电化学腐蚀法自制钨针尖作为探针.

## 2 结果

分离纯化得到神经丝,在 SDS-PAGE 电泳中,呈现分子量各为 68,160 和 200 ku 的 3 条主带,分别为 NF-L, NF-M 和 NF-H. 电镜观察的结果表明,神经丝具有典型的中间纤维结构,但是难以分辨出比较细微的结构.

图 1 是一根纤维状结构的 STM 图象,其直径在 10 nm 左右. 纤维表面的两侧有周期性的突起(如箭头所示),这些突起间的距离近似 10 nm. 在图 2 的 STM 图象中,可观察到 3 条长的杆状结构,其长度远远超出扫描范围,宽度和高度均在 10 nm 左右((10.2  $\pm$  0.8) nm). 其表面不光滑,也有周期性的突起,并有很多须状物从长杆的两侧横向伸出. 根据长杆的直径及整体形态,可以推断这种结构为神经丝,杆状结构为核心纤维,突起为侧臂. 图 1 中的突起可能是制样过程中因干燥而完全收缩的侧臂,未能向两侧伸展. 图 1 和图 2 均为原始图象,未经任何滤波处理.

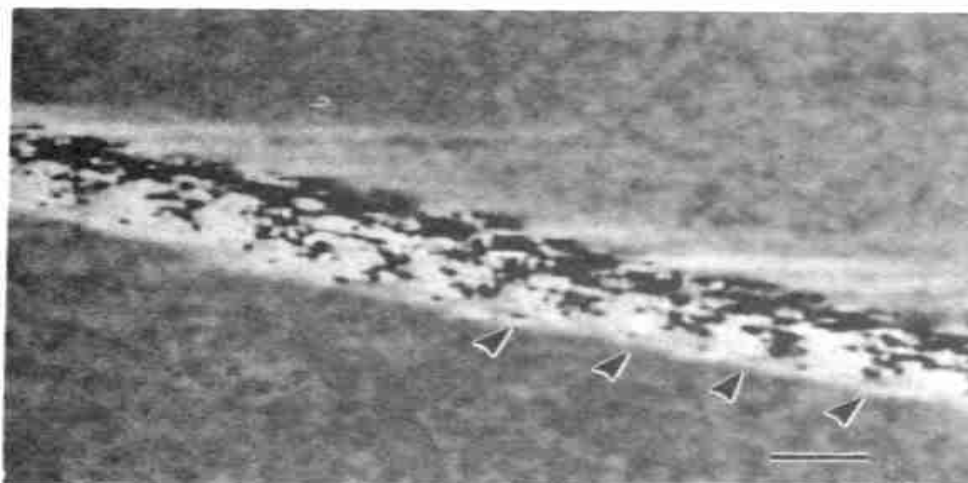


图1 神经丝的 STM 图象

隧道电流 = - 0.50 nA, 偏压 = 192 mV, 标尺为 10 nm, 箭头所示为收缩的侧臂

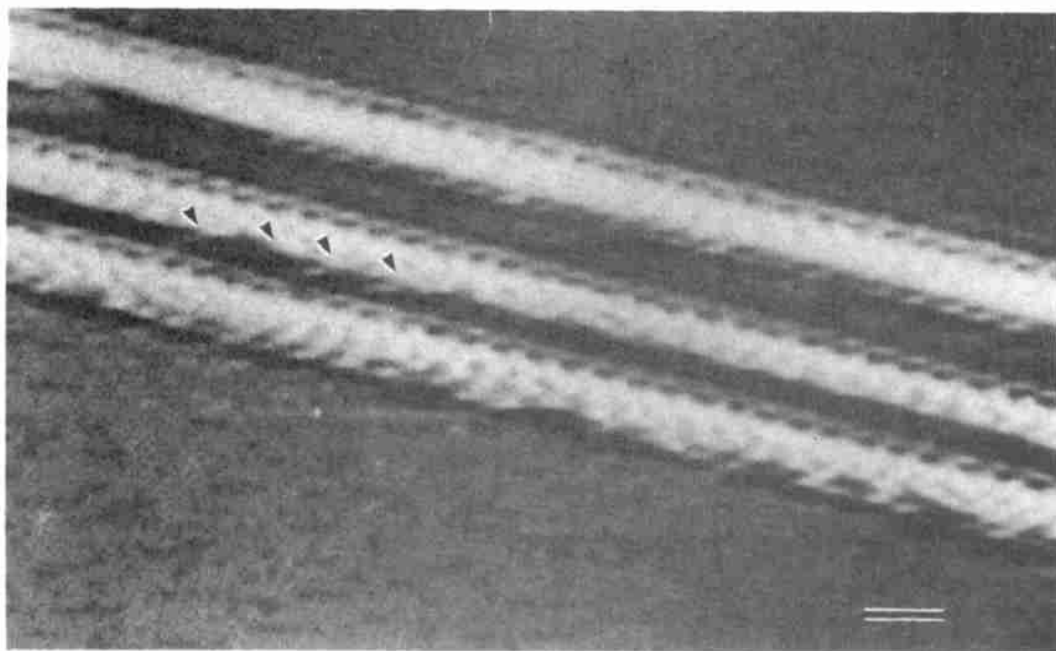


图2 神经丝的 STM 图象

隧道电流 = - 0.10 nA, 偏压 = 479 mV, 标尺为 20 nm, 箭头所示为长侧臂

从 STM 图象可以看出,相邻两根侧臂之间的距离大约为 10 ~ 11 nm,与其直径相近. 图 2 中侧臂的长短不一. 大多数侧臂较短,有些位于两根并排的纤维间的侧臂比较长(如箭头所示),相邻的长侧臂之间的距离为 21 nm 左右,与金属投影所观察到的侧臂的周期性排列方式

很接近。由于侧臂在制样过程中发生收缩,很难确定侧臂的长度。长的侧臂之所以能够观察到,可能在于相邻两根核心纤维之间的相互作用。换句话说,长侧臂的末端固定在另一根纤维上而未能收缩。这样的侧臂正像体内神经丝之间的横桥。其他区域的侧臂处于“游离”状态而易于收缩、附着在核心纤维表面。此外,长短不同的侧臂可能由不同的多肽形成。根据以往的研究结果,侧臂是 NF-M 或/和 NF-H 的 C-末端形成的。但是用目前较为普遍的半分子交叉模型难以解释相邻侧臂间的 10 nm 距离。

### 3 讨论

神经丝蛋白 3 组分如何组装成天然神经丝,至今还不清楚。根据已有的结果,3 个组分的杆状区都参与了核心纤维的构建,而周期性排列的侧臂则是由 NF-M 和 NF-H 的羧基端非螺旋区形成的<sup>[3,4]</sup>。由 NF-L 单独组装成的纤维也存在 20 nm 左右的周期性结构。基于对 NF-L 组装的研究和 20~22 nm 周期的存在,人们提出了许多装配模式<sup>[5,6]</sup>。根据这些模式,神经丝组装经过二聚体、四聚体、八聚体、亚丝等几个阶段,最终形成 10 nm 纤维。在这个组装过程中,发生了杆状区的半分子交叉,从而产生 20~22 nm 的周期性结构。半分子交错发生在哪个步骤,不同模型中有不同的观点,有的认为二聚体以半分子交叉方式形成四聚体,有的认为交叉发生在八聚体之间。此外,NF-L 的装配方式是否与天然神经丝的装配方式相同,现在尚不能确定。

STM 的观察结果表明,天然神经丝存在 2 种侧臂:长侧臂的周期性间距是 21 nm,与金属投影的结果相同;相邻的短侧臂之间的距离只有 10~11 nm,是前者的一半。考虑到在风干过程中,长的侧臂会收缩变短从而难以与短的侧臂相区别,因此有理由推断长侧臂和短侧臂是相间排列的。长侧臂由 NF-M 和 NF-H 的羧基末端组成,短侧臂可能由 NF-L 的羧基末端组成<sup>[4]</sup>。由于 NF-L 的羧基末端很短,所以用金属投影方法制样时很难被观察到,只有 NF-M 和 NF-H 形成的间距为 21 nm 的长侧臂才能够被检测到。半分子交叉模型是基于 22 nm 的周期性结构提出的,不能解释 10 nm 周期的存在,这表明某些单元结构在组装时必定发生了 3/4 交叉。据此,我们提出神经丝组装的一个新模型(图 3)。

在这个模型中,神经丝装配的第 1 步是二聚体的形成。研究表明,只存在 3 种类型的二聚体:NF-L/NF-L, NF-L/NF-M 和 NF-L/NF-H。NF-M 和 NF-H 不能单独形成二聚体<sup>[4,7]</sup>。然后 2 个相同的二聚体平行、对齐形成四聚体<sup>[5]</sup>。接下来,不同类型的四聚体以反平行、3/4 交叉方式构成八聚体,八聚体进而连接形成原丝,4 条原丝缠绕、以半分子交叉方式形成神经丝。在图 3 中,为简便,只用 1 条曲线代替由四聚体伸出的侧臂,短曲线表示单纯由 NF-L 形成的四聚体产生的侧臂,而长曲线则代表 NF-M 或 NF-H 与 NF-L 共同形成的四聚体所产生的侧臂。其中,4 个分子的羧基末端怎样缠绕、排布有待于进一步的研究。

根据这个模型,由 NF-M 和 NF-H 形成的长的侧臂和由 NF-L 形成的短的侧臂沿核心纤维相间排列。相邻长或短侧臂之间的距离为 22 nm 左右。从侧向看,相同的四聚体间发生半分子交叉,不同四聚体间发生 3/4 交叉,同种类型的四聚体间不存在 3/4 交叉。因此,NF-L 单独组装时依照半分子交叉模型,产生 22 nm 的周期性结构。

按照我们的模型,天然神经丝中 3 种组分的比率应为:NF-L (NF-M + NF-H) = 3 : 1。根据考马斯亮蓝染色后,薄层层析扫描结果推算 3 种组分的相对含量,NF-L (NF-M + NF-H) 大约为 2.5 : 1,接近 3 : 1。

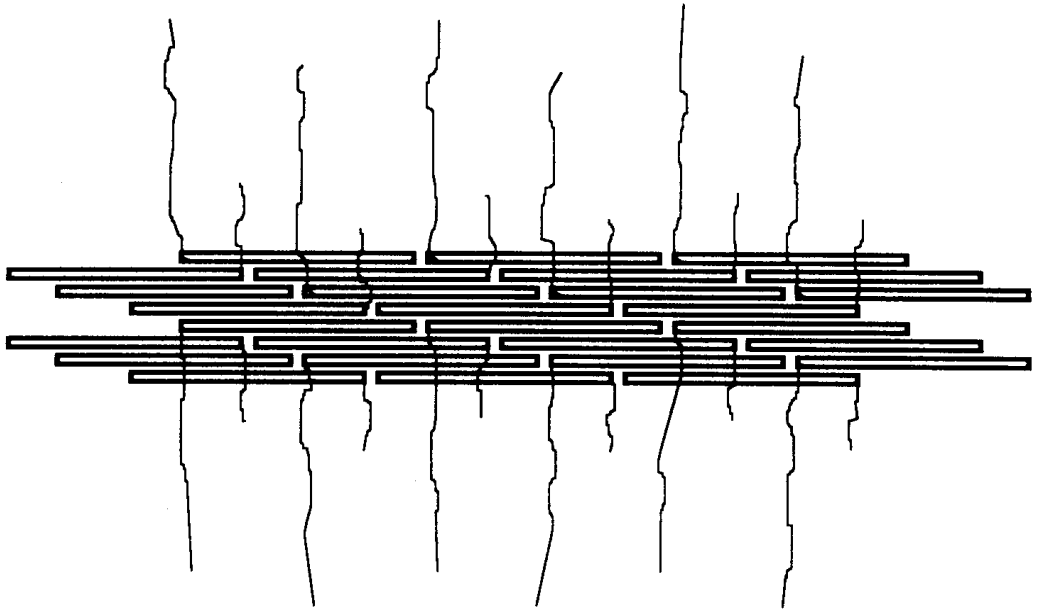


图3 天然神经丝的结构模型  
方框表示四聚体,曲线表示由四聚体伸出的侧臂

STM 是研究表面结构的有力工具. 我们应用 STM 技术观察到神经丝的许多新的结构细节,有助于揭示神经丝中各组分的排布方式. 进一步的研究仍在进行中.

### 参 考 文 献

- 1 Hirokawa N, Glicksman M A, Willard M B. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol*, 1984, 98: 1 523 ~ 1 536
- 2 Scott D, Smith K E, O'Brien B J, et al. Characterization of mammalian neurofilament triplet proteins. *J Biol Chem*, 1985, 260(19): 10 736 ~ 10 747
- 3 Hisanaga S, Hirokawa N. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol*, 1988, 202: 297 ~ 305
- 4 Mulligan L, Balin B J, Lee V M Y, et al. Antibody labeling of bovine neurofilaments: implications on the structure of neurofilament sidearms. *J Struct Biol*, 1991, 106: 145 ~ 160
- 5 Hisanaga S, Ikai A, Hirokawa N. Molecular architecture of the neurofilament . Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. *J Mol Biol*, 1990, 211: 857 ~ 869
- 6 Heins S, Wong P C, Muller S, et al. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas end domains specify filament assembly and network formation. *J Cell Biol*, 1993, 123: 1 517 ~ 1 533
- 7 Carpenter D A, Ip W. Neurofilament triplet protein interactions: evidence for the preferred formation of NF-L-containing dimers and a putative function for the end domains. *J Cell Sci*, 1996, 109: 2 493 ~ 2 498

(1998-02-05 收稿,1998-04-24 收修改稿)