

细胞的原子力显微镜最佳成像条件研究*

齐 浩^{1,2} 刘 颖¹ 庄乐南² 朱 杰¹ 孙润广¹

(1 陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理与生物医学工程研究室, 西安 710062)

(2 陕西师范大学生命科学学院细胞室, 西安 710062)

摘 要 通过对不同处理条件和测试条件下人肝癌细胞 SMMC-7721 的原子力显微镜图像的分析和研究, 得到了在大气环境和溶液环境中肝癌 SMMC-7721 细胞的最佳成像条件, 同时建立了用原子力显微镜观测活细胞的实验方法. 使用 0.5%、1%、1.5% 的戊二醛溶液固定细胞后再漂洗, 变换原子力显微镜的扫描模式, 调节扫描参量并在大气环境下观测以寻找该环境下的最佳成像条件; 将用多聚赖氨酸处理基底后的培养细胞直接放置于生理溶液中用原子力显微镜进行溶液环境观测, 比较扫描时限并分别改变环境液体类型、探针以及扫描频率, 比较了不同条件下原子力显微镜图像的差别, 在得出最优参量的同时对其相关原理进行了分析, 建立了活细胞实时观测的实验方法. 比较两种条件下的细胞图像发现, 戊二醛溶液固定过的细胞与生理溶液环境中的活细胞有很大差别, 在生理溶液条件下的细胞饱满, 可见到光滑清晰的细胞边缘; 但戊二醛溶液固定的细胞表面粗糙, 细胞边缘不清晰, 表明固定后观测到的细胞与生理状态下活细胞的表面形貌存在很大差异.

关键词 生物光学与光生物物理学; 细胞的原子力显微镜观测技术; 实时观测; 活细胞; 固定细胞

中图分类号 Q6; Q256

文献标识码 A

文章编号 1004-4213(2007)01-0138-6

0 引言

1986 年 IBM 公司的 Binning 和斯坦福大学的 Quate 及 Gerber 合作发明了原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM)^[1]. 自此 AFM 以其分辨率高、实时、原位成像、制样简单 (不受样品导电性、干燥度、形状、硬度、纯度等限制), 可在大气、常温环境甚至是溶液中成像, 同时具备纳米操纵及加工功能, 系统及配套相对简单、廉价等优点而备受关注, 并已在生命科学、材料科学等领域发挥了重大作用, 而且人们也在不断地对其进行改进以适应特定领域的研究^[2-3]. 近年来 AFM 对生物样品的测量更是得到了长足的发展, 如对细菌、植物、动物的组织、细胞、细胞器、生物大分子等均进行了观察^[4]. 但到目前为止, AFM 对细胞成像特别是活细胞成像的质量并不理想, 主要因为细胞膜表面比较柔软, 细胞难以牢固地固定于基底表面, 探针的压力使探针与细胞表面的接触面积大大增加, 影响成像分辨率, 或造成细胞损伤、变形及漂移^[5-7]. 国内相关活细胞观测的报道很少^[8], 且成像质量并不理想, 国外虽有一些相关报道^[8], 但对成像技术的描写不够详细, 按照文献描述无法获得质量较好的活细胞图像. 细胞的不同处理条件和观测条件都会影响到成像质量, 为了研究细胞在大气和溶液环境中的最佳观测与成像条

件, 本文从细胞处理以及参量设置等方面对细胞的 AFM 成像条件进行研究, 并试图提供影响成像因素的解决方案.

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

细胞系: 人肝癌 SMMC-7721 细胞, 细胞用 10% 小牛血清 (体积分数) 和双抗 (青霉素、链霉素, 终浓度为 200 U/mL) 的 RPMI 1640 培养基培养于 12 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 细胞生长在 1 cm×1 cm 的盖玻片上, 其中一部分玻片事先用多聚赖氨酸处理, 作为对照. 选生长良好的细胞进行实验.

实验仪器: 日本岛津公司 SPM-9500J3 with WET CNII 型原子力显微镜; Si₃N₄ AFM 探针, 200 μm 长的微悬臂, 弹性系数 0.12 N/m; Si₃N₄ AFM 探针, 100 μm 长的微悬臂, 弹性系数 0.06 N/m.

1.2 实验方法

1.2.1 大气成像系统实验

用 Hanks 缓冲液将贴附在盖玻片上生长的细胞轻轻漂洗后, 用浓度分别为 0.5%、1%、1.5% 的戊二醛溶液固定 15 min 作为对照, 固定后的盖玻片用 Hanks 缓冲液轻轻漂洗三遍, 置入缓冲液中备用. 实验时, 先将盖玻片取出, 晾干水分后放到 AFM 的观测台上. 扫描方式分别为接触模式和轻敲模式. 先用 50 μm 的尺度进行大范围扫描以发现细胞, 然后不断缩小扫描范围以获得完整清晰的细胞图像,

* 陕西师范大学校级重点项目 (995098) 资助

Tel: 029-81967911 Email: qh@snnu.edu.cn

收稿日期: 2005-09-26

并观察细胞表面的微细结构。

1.2.2 Hanks 缓冲液成像系统实验

用 Hanks 缓冲液将细胞贴片轻轻漂洗后,粘在观察片上并放入 AFM 的液体池中,观察液选用 Hanks 缓冲液。溶液环境中采用接触式进行细胞的扫描观察。并将针尖污染前后的图像进行比较。所有的 AFM 图像只做普通整平处理。

2 实验结果与分析

2.1 大气中固定细胞成像条件研究

2.1.1 不同浓度戊二醛溶液固定的细胞在大气中

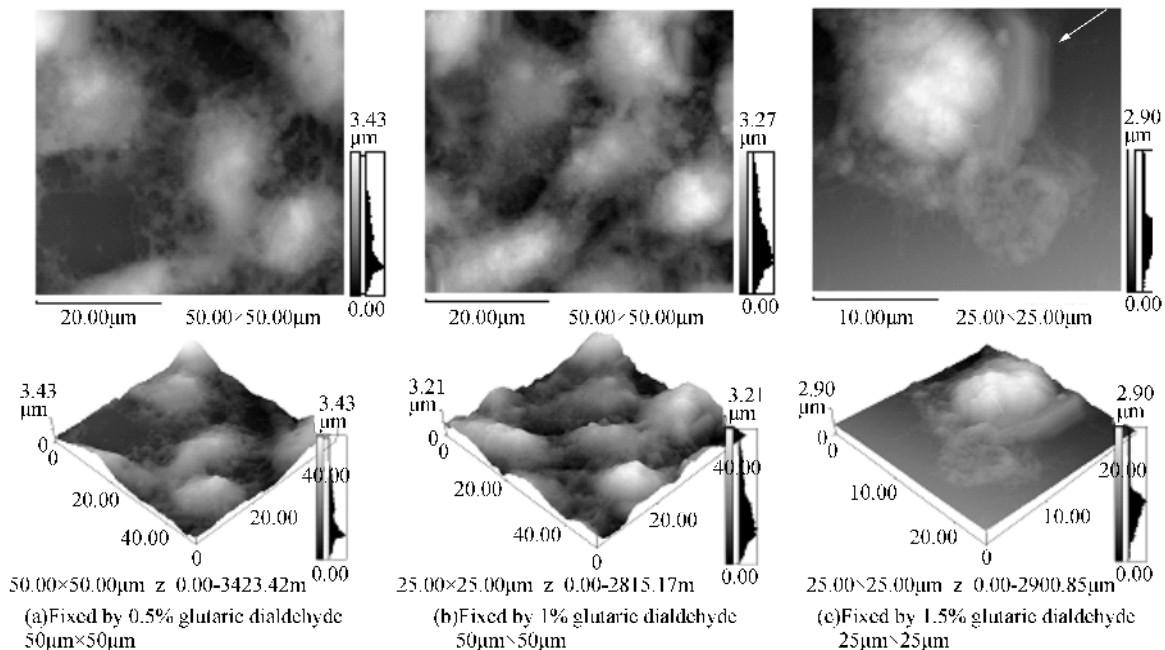


图 1 不同浓度戊二醛固定的人肝癌 SMMC-7721 细胞在 contact 模式下的 AFM 图像(包括平面和三维立体图)

Fig.1 AFM image about the SMMC-7721 cells fixed by different concentrate of glutaric dialdehyde under the contact mode(containing plan figure and three-dimensional figure)

管、内质网、糖蛋白、糖原等细胞结构和成分有较好的固定作用。比较图 1(a~c)可以发现,随固定剂浓度的升高,细胞表面的粗糙度增加,致使细胞形貌有较大差别。固定后的细胞图像与活细胞实时图像(图 6)相比,0.5%和 1%浓度下,戊二醛溶液固定的细胞比较接近活细胞的形貌。因此,对于人肝癌 SMMC-7721 细胞,最佳的戊二醛溶液固定浓度为 0.5%~1%。但不同细胞需要的最佳固定剂浓度是不同的,对于原代培养的小鼠肝细胞来说,其最佳戊二醛固定剂的浓度为 1%~1.5%。因此,在进行空气环境 AFM 的观测之前必须进行预实验,以筛选合适的固定液浓度。

2.1.2 不同扫描模式的图像比较

图 2(a,b)是固定后的细胞在接触模式下观测到的 AFM 图像,图 2(c)是固定细胞在轻敲模式下的 AFM 图像,两种扫描模式下的细胞均用 1%戊二

的 AFM 图像分析

图 1(a~c)分别是经浓度为 0.5%、1%、1.5%的戊二醛溶液固定后的细胞图像,包括平面图和立体图,图 1(a,b)成像清晰,可见细胞表面的细微结构。细胞表面有不明显的突起,边缘呈均匀分布的絮状结构且与其它细胞彼此相连。图 1(c)的清晰度较差,细胞表面出现成簇的细胞突起,细胞边缘的突起十分明显(箭头处)。

固定选择戊二醛溶液的原因是在以往的工作中发现,戊二醛与其它固定剂相比能够最大限度的使细胞表面形貌接近生活的原始状态^[9]。戊二醛对微

醛固定,比较图 2(b)和图 2(c)发现,虽然两种模式均能清晰的显示细胞的细微结构,但轻敲模式可以获得更为理想的细胞图像。

轻敲模式对细胞精细结构的真实描绘优于接触模式,主要是因为生物分子的弹性模量较低,同基底间的吸附接触力也很弱;在接触模式下,针尖-样品间的压缩力和摩擦力容易使样品发生形变,从而降低成像质量。而轻敲模式扫描时,在共振频率附近以更大的振幅(>20 nm)驱动微悬臂,使针尖与样品间断接触。由于针尖与样品接触使前者对细胞表面精细结构的描述与接触模式一样好,又因为轻敲模式时针尖与生物样品的接触非常短暂,使剪切力引起的样品变形和破坏几乎消失,Hong^[10]等人用探针损伤细胞的实验证明了这一分析。AFM 探针导致细胞损伤的现象往往发生在正常观测条件时的接触模式下,细胞损伤程度与细胞的种类和生长状

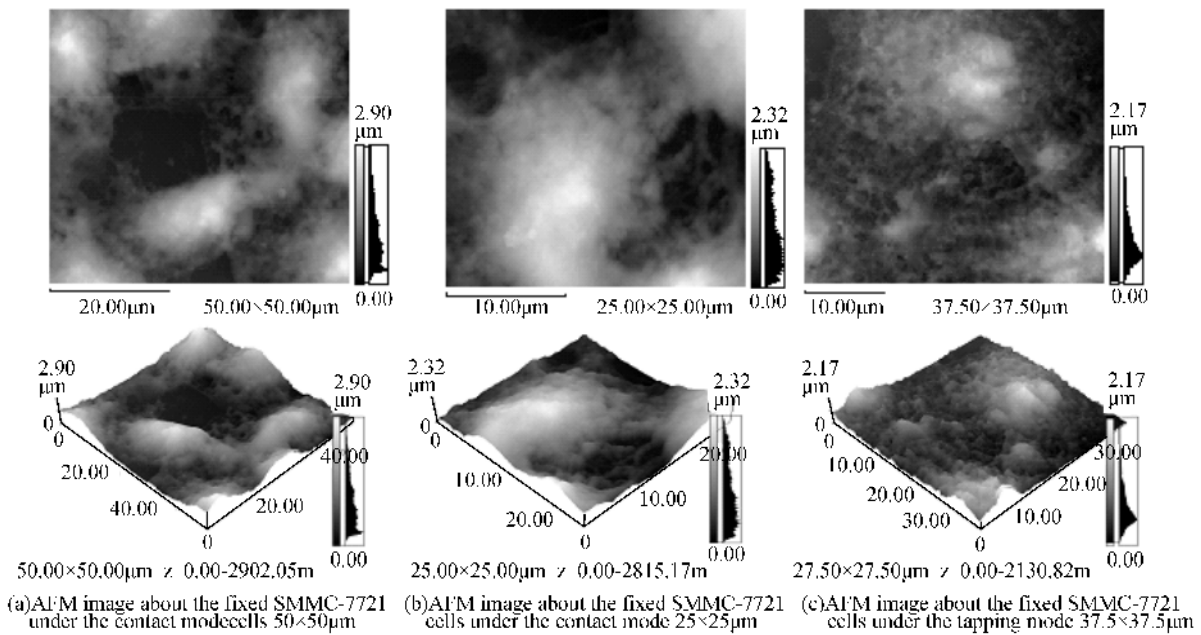


图2 人肝癌 SMMC-7721 细胞在不同扫描模式下得到的 AFM 图像

Fig. 2 AFM image about the fixed SMMC-7721 cells under different modes

态相关,而损伤细胞在表面形貌方面将会产生明显的变化。

2.1.3 扫描频率

通过实验发现扫描频率对成像有极大的影响,扫描频率过大会使图像产生拖尾现象,致使细胞成像边界不清晰,容易造成细胞损伤。而扫描频率过低又会使扫描时间延长。在实验中发现细胞的最佳观测扫描频率应在 0.5~2Hz 之间,在该范围内可根据扫描范围的大小自行选择。

2.2 液体中活细胞成像条件研究

2.2.1 不同溶液环境

大量实验证明溶液环境的选择对观测有很大影响,通过实验发现观测人肝癌 SMMC-7721 细胞时,选用 Hanks 缓冲液成像比较清晰。在选择溶液环境时要考虑两个因素:1)不同的溶液环境中溶质对激光反射强度的影响;2)溶液环境的 pH 值、盐浓度对针尖与样品间的非特异性相互作用的影响,可以通过选择环境液体的 pH 值和盐浓度,利用排斥的静电力来有效抵制液体、探针之间的范德华力,降低总的针尖与样品之间的相互作用力;通过溶液环境的调节来降低针尖与样品间黏附力,减小非特异性相互作用对成像的影响,还可使样品在成像过程中不被损坏。所以,在 Hanks 溶液中进行实验可以避免表面所带电荷使针尖与样品的作用力过大,静电力能够降至最小的限度。

2.2.2 基底的处理

采用弹性系数 0.06 N/m 的 AFM 针尖,扫描频率 0.3 Hz,以 Hanks 为观察液,对未经多聚赖氨

酸处理基底的细胞可进行 2~3 次扫描成像,此后若再进行扫描细胞就会脱离基底而无法成像。经多聚赖氨酸处理基底的细胞则能被反复多次扫描成像,室温 25℃ 时,细胞在 30~40 min 内应不会与基底脱离。

经多聚赖氨酸处理过的玻片上生长的培养细胞贴附牢固,在观测时有利于细胞抵抗探针的损伤^[5]。尽管如此,随扫描时间延长,细胞仍会缓慢地改变形状,例如细胞边缘会向内部缩回,有时会失去它们对基底的黏附,离开基底表面或者漂浮于液体中。因此如何增加细胞对基底的黏附力是获得良好生活细胞图像的的重要条件之一^[5,9]。

2.2.3 探针的选择

图 3 是弹性系数为 0.12 N/m 的探针进行二次扫描时产生的图像,图中只能看见半个细胞。这是

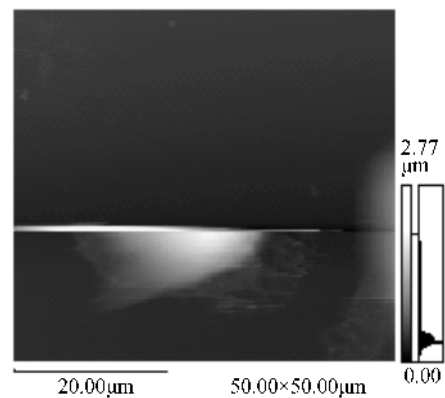


图3 由于探针弹性系数过大造成的细胞漂移 ($k=0.12 \text{ N/m}$)

Fig. 3 The cells excursion because of the bigger value of the probe coefficient ($k=0.12 \text{ N/m}$)

由于细胞因悬臂弹性系数的影响而发生了移动,或者细胞已经被探针挂伤而丢失. 针尖的弹性系数 k 是 AFM 针尖的重要参量之一 ($k = F/\Delta d$, 其中 F 代表施于悬臂的力, Δd 代表悬臂在力的作用下发生的挠度), 实验结果表明, 弹性系数过大, 会造成活体细胞的严重变形或使其脱离基底(如图 3); 弹性系数过小, 对细胞的分辨率较差^[8]. 所以选择弹性系数适当的悬臂至关重要, 对于活体细胞扫描来说, 一般选择 AFM 探针的弹性系数在 0.02~0.06 N/m 的范围之间.

2.2.4 扫描频率的改变

图 4 和图 5 的扫描频率分别为 1 Hz 和 0.4 Hz, 图 4 中可以很明显的看出由于频率过大使得细胞损伤或漂移(箭头处). 图 5 中的扫描频率选择比较恰当, 得到的图像比较完整, 平滑, 成像质量较好.

在溶液环境中扫描频率对细胞成像的影响比大气环境要大, 尤其大范围扫描时更加明显. 这可能有两方面的原因: 一是未经固定的细胞表面十分柔软, 二是扫描频率过快会引起溶液大的扰动, 不利于探针和细胞相互作用时的稳定(如图 4). 认为活细胞扫描时应将频率设置在 1 Hz 以下, 具体参量设置

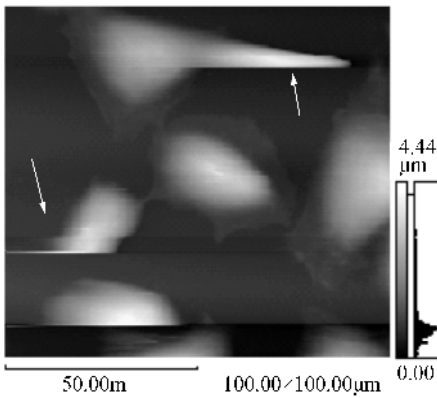


图 4 频率为 1 Hz 时扫描的 AFM 图像
Fig. 4 AFM image when the frequency is 1 Hz

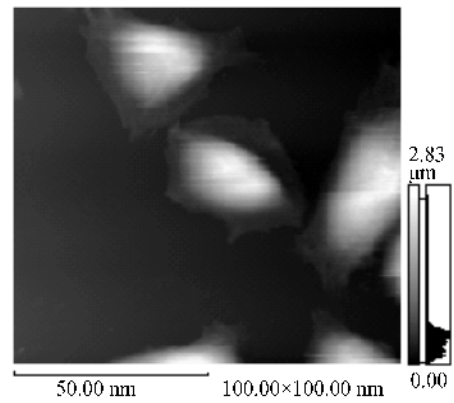


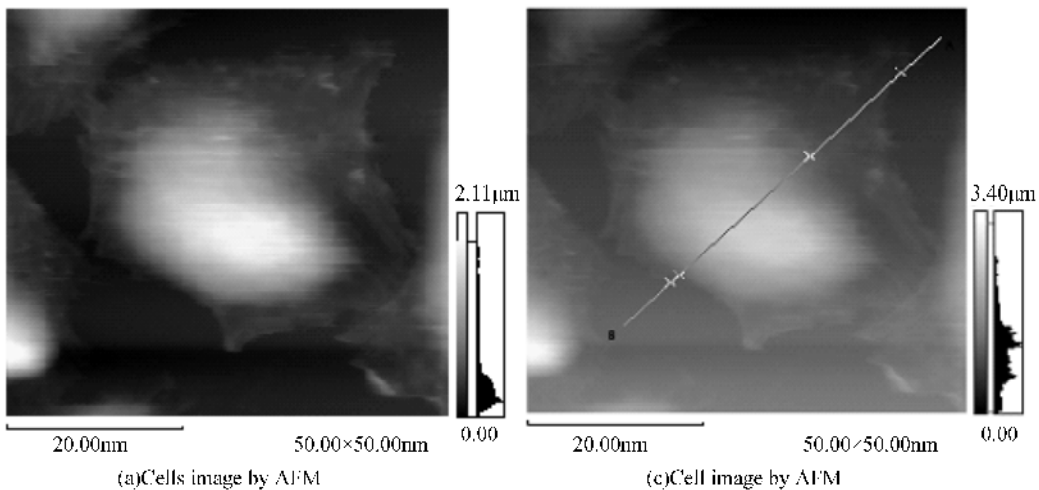
图 5 频率为 0.4 Hz 时扫描的 AFM 图像
Fig. 5 AFM image when the frequency is 0.4 Hz
要根据扫描范围来确定.

2.2.5 针尖污染对图像的影响

当活细胞实时观测结束后, 在大气环境中用同一探针对标准样品进行扫描, 发现了明显的多针尖图像. 这种现象说明探针在溶液环境中测量时会被污染, 所以再度利用前, 对针尖的清洗至关重要, 对观测要求较高的实验, 最好换用新的针尖. 虽然活细胞实时观测时采用弹性系数较小的针尖并且使施于针尖的力尽可能小, 但由于细胞表面过于柔软, 针尖的污染在实验观测中是难以避免的.

2.3 大气环境中固定细胞与溶液环境中活细胞 AFM 图像比较

图 6(a, b, c) 是活细胞在溶液环境中的原子力显微镜图像, 其中(a)(b)为平面图, (c)为立体图, 图 6(d)是图(c)中细胞从 a 点到 b 点的横截面, 虚线表示细胞隆起的部位, 其中央处是细胞核所在的位置, 实线给出整个细胞的尺度. 从图 6(a)(d)可见活细胞表面平滑饱满, 细胞边缘呈现多角形分布, 与该细胞的特征相符^[11]. 该图像与图 2(a)比较时发现, 活细胞(图 6a)表面与固定细胞表面(图 2(a))的形貌有明显差异, 活细胞表面平滑完整, 细胞边缘极薄且清晰, 呈多角形形态. 而固定细胞的表面粗糙不平,



(a)Cells image by AFM

(c)Cell image by AFM

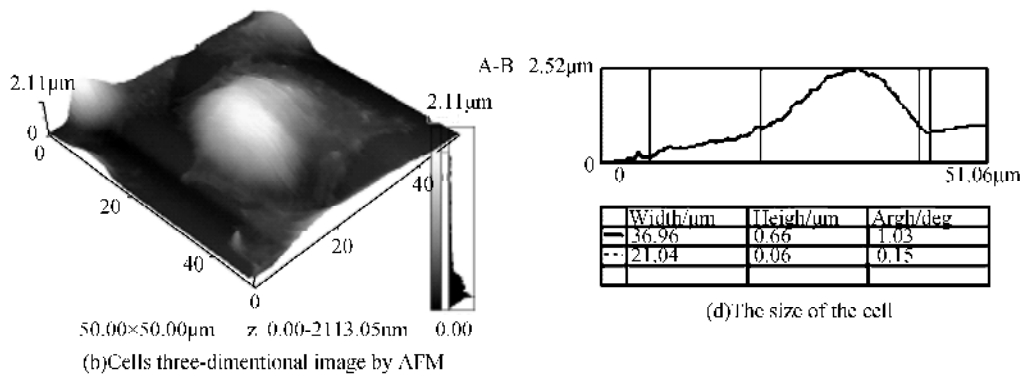


图6 人肝癌 SMMC-7721 活细胞在生理溶液中的原子力显微图像($50\ \mu\text{m}\times 50\ \mu\text{m}$)
Fig. 6 AFM imaging on living human liver cancer 7721 cells($50\ \mu\text{m}\times 50\ \mu\text{m}$)

细胞边缘外围支离破碎且边界不清. 因此, 固定后的细胞表面与生理状态下活细胞表面存在很大差异. 若使用 AFM 来研究细胞的表面结构与功能, 用固定细胞获得的观测结果是有瑕疵的.

用 AFM 对活细胞成像进行研究, 不仅能在纳米级的微小尺度上了解细胞的表面形貌, 更重要的是可用 AFM 对生活细胞表面的其它特性进行研究, 例如受—配体之间的作用力、细胞表面各种结构的特点以及细胞膜的稳定性等等.

3 结论

在大气环境中观测时, 提高 AFM 成像质量的关键是对样品的处理和扫描参数的选择. 首先应筛选合适的固定剂及浓度, 不同的细胞的最佳固定条件是不同的, 例如 7721 细胞以 0.5%~1% 浓度的戊二醛溶液固定时成像质量最好, 而肝细胞的最佳固定浓度则为 1%~1.5%, 因此, 空气环境中 AFM 对细胞固定条件的要求较高. 在相同的固定条件下, 探针的轻敲模式比接触模式能获得更为清晰的细胞图像, 同时轻敲模式对细胞的损伤也比较小, 因此在大气环境中观察细胞时推荐使用轻敲模式. 探针的扫描频率对成像也有很大影响, 速度过快会在图像上产生拖尾现象, 故扫描频率一般控制在 0.5~2 Hz 之间, 具体则根据扫描范围的变化进行选择, 扫描范围较小时所用的扫描频率也应减小. 探针的扫描准确度通常选择 256×256 或者 512×512 .

在生理溶液的环境中, 由于细胞是未经任何处理的活细胞, 因此细胞与基底的粘附程度以及 AFM 最佳参数的选择变得至关重要. 为了使细胞与基底有更好的粘附能力, 可采用特殊试剂包被基底表面的方式进行预处理, 本文所使用的方法是用多聚赖氨酸处理玻片后再进行贴片培养. 选用探针时, 应选择弹性系数较低的探针, 其范围约为 0.02~0.06 N/m; 进行大范围扫描时速度应尽可能小, 最好不超过 1 Hz; 实验完成之后要及时清洗探针, 以备下次使用.

比较大气环境中固定后的细胞图像与溶液环境条件下的活细胞图像, 结果表明用戊二醛溶液固定过的细胞与生理环境中观察到的活细胞有很大差别. 生理环境中的细胞边缘光滑清晰, 细胞饱满并呈多角形分布. 而固定细胞的边缘粗糙, 表面凹凸不平, 细胞边界不清. 因此, 对于以细胞功能为研究目的的实验, 采用固定细胞获得的结果会存在某些缺陷, 应当采用生理溶液中的活细胞进行观察, 以真实的了解细胞结构与功能的关系.

参考文献

- [1] BINNING G, QUATE C F, GERBER C. Atomic force microscope[J]. *Phys Rev Lett*, 1986, **56** (9):930-933.
- [2] ZHANG Hu, ZHANG Hai-jun, ZHANG Dong-xian, et al. Atomic force microscope measuring in liquid and its applications[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(10):1273-1276.
张虎, 张海军, 张东仙, 等. 液相型原子力显微镜的研制及应用[J]. 光子学报, 2004, **33**(10):1273-1276.
- [3] ZHANG Dong-xian, ZHANG Hai-jun, LI Bo, et al. A new type of atomic force Microscope and its applications [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(1) :50-54.
张冬仙, 张海军, 李博, 等. 新型原子力显微镜的研制及其应用[J]. 光子学报, 2002, **31**(1) :50-54.
- [4] YANG Yu-xiao, WANG Yong-feng, XIONG Kai-li, et al. Study of the key technology of optical fiber biosensor [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(1):121-125.
杨玉孝, 王永峰, 熊开利, 等. 光纤生物免疫传感器原理及关键技术研究[J]. 光子学报, 2005, **34**(1):121-125.
- [5] HENDERSON E, HAYDON P G, SAKAGUCHI D S. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy[J]. *Science*, 1992, **257**(5078): 1944-1946.
- [6] HOH J H, SCHOENENBERGER C A. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy[J]. *Biophysics J*, 1994, **107**(5):1105-1114.
- [7] PUTMAN, WERF K O, GROOTH B G, et al. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy[J]. *Biophysics J*, 1994, **67**(4):1749-1753.
- [8] WANG Li-juan, ZHANG Ying-ge, ZHANG Sa, et al. Study on the basic conditions affecting the atomic force microscopic

- observation of the living cells in physical solutions [J]. *Microscopy Society*, 2005, **24**(1): 79-84.
- 王莉娟,张英鸽,张飒,等. 原子力显微镜对生理溶液中活细胞成像条件的研究[J]. 电子显微学报,2005,**24**(1):79-84.
- [9] ZHUANG Len-an,QI Hao, SUN Run-guang,*et al.* Real time observation on cells in different fixed conditions and living cells in buffer solution by afm[J]. *Acta Biophysica Sinica*,2005,**21**(5):345-349.
- 庄乐南,齐浩,孙润广,等. 不同固定条件下细胞与活细胞的原子力显微镜实时观察[J]. 生物物理学报,2005,**21**(5):345-349.
- [10] HONG Xing-you, JOAN M Lau, ZHANG Sheng-wen, *et al.* Atomic force microscopy imaging of living cells; a preliminary study of the disruptive elect of the cantilever tip on cell morphology[J]. *Ultra Microscopy*, 2000,(82): 297-305.
- [11] ZHANG Wu-yang,TAO Wen-zhao,DONG Rong-chun,*et al.* SMMC-7721 human hepatoma cell obsrved by electro microscopy and light microscopy. *Academic Journal of Second Miliary Medical University*,1981,(1): 10-14.
- 张武扬,陶文照,董荣春,等. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的电镜和光镜观察[J]. 第二军医大学学报,1981,(1):10-14.

The Research on best imaging Condition of the AFM on Cells

QI Hao^{1,2}, LIU Ying¹, ZHUANG Le-nan², ZHU Jie¹, SUN Run-guang¹

(1 *Biophysics Lab, College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062*)

(2 *Biological department of Shaanxi Normal University, Xi'an 710062*)

Received date:2005-09-26

Abstract Through comparing the atomic force microscope (AFM) images of the 7721 cells under different treatment conditions and observation conditions, the best imaging condition of SMMC-7721 cells in the air and buffer solution was gotten, at the same time the experimental method of imaging living cells was established. Cells were fixed by 0.5%, 1%, 1.5% glutaric dialdehyde, then washed by PBS three times, and observed in air circumstance with different scanning modes of AFM and scanning parameters to find the best figuring conditions in this circumstance. The living cells were cultured on the glass covered by polylysine, then put in the physiological solution and observed by the AFM directly. Compared the scanning time limit with changed the type of the circumstance solution, scanning tip and scanning frequency to get the optimized parameter. Images of the fixed cells were compared with the ones of living cells, and found very different. The living cells in the physiological solution were satiety and the edge was slick, but the edge and the surface of the fixed cells were rough and looked as fragmented.

Key words Biooptics and Light Biophysics; AFM observation technique of cells; Real-time observation; The fixed cells; The living cells



QI Hao was born in 1955. She received her M. S. degree from Shaanxi Normal University in 1987. She is an associate professor of Shaanxi Normal University at present. She has written many articles in *Science in China*, *Chinese Science Bulletin*, et al. She has took part in and completed many scientific projects such as 95 projects, 863 projects, the national natural sciences fund and Shaanxi Province natural sciences fund.