

原子力显微镜在生物医学中的应用*

张德添 张 飒 何 昆 杨 怡 周 涛 张英鸽

(国家生物医学分析中心,毒物药物研究所 北京 100850)

摘 要 原子力显微镜(AFM)是近十几年来表面成像技术中最重要的进展之一。它具有非常高的分辨率。本文将阐述原子力显微镜的工作原理,分析原子力显微镜在生物医学中的应用现状,包括生物医学样品的表面形貌观测,在液体中的观测,生物分子之间力谱曲线的观测,以及生物医学样品制备技术等。

关键词 原子力显微镜 分辨率 生物分子

前言

原子力显微镜(Atomic Force Microscopy,简称AFM)¹是近十几年来表面成像技术中最重要的进展之一。其原理是将针尖制作在一个对微弱力极敏感的V字形的微悬臂上,微悬臂的另一端固定住,使针尖趋近样品表面并与表面轻轻接触,由于针尖尖端原子与样品表面原子之间存在着微弱的排斥力,当针尖进行扫描时,可通过反馈系统控制压电陶瓷管伸缩来保持原子间的作用力恒定,带有针尖的微悬臂将随着样品表面的起伏而颤动,利用激光束偏转和光学检测方法得到样品表面形貌的信息。AFM有两种工作模式:恒高模式(保持样品和探针间的距离不变,测量每一点作用力的大小)和恒力模式(保持样品和探针间作用力不变,测量每一点高度的变化)。这两种模式都可以得到与表面形貌有关的丰富信息,经过计算机采集、处理,并成像。

与传统的扫描电子显微镜相比,AFM它具有非常高的横向分辨率和纵向分辨率,其中横向分辨率可达到0.1~0.2nm,纵向分辨率高达0.01nm,这是扫描电子显微镜很难达到的。AFM具有很宽的工作范围。可以在诸如真空、大气和各种液体环境中使用,还可以在低温环境进行研究,观测的生物医学样品可以从单个分子到整个细胞。AFM还可以在分子水平上进行力谱曲线的检测,研究其结构和功能的关系,这在生物医学研究中具有重要的意义²。当然,原子力显微镜在生物医学应用中也存在一定的局限性和困难。譬如在生理条件下对活细胞进行成像观察时,存在各种影响因素。如针尖与细胞表面的非特异性相互作用情况确定、AFM悬臂最佳弹性系数的选择、如何增加细胞表面韧性、观察培养液

的选择、基底的处理、扫描频率的确定、污染后针尖的清洗等诸多问题,都必须提供相应的解决方案。

1 原子力显微镜在生物医学中的主要应用

1987年,世界上成功地推出第一台商业化的扫描隧道显微镜(STM)。大约过了两年,又推出第一台商业化的原子力显微镜(AFM)。它们也可统称为扫描探针显微镜(SPM)。SPM是继光学显微镜和电子显微镜之后的第三代显微镜。这是一类以物理学为基础,集多种现代科技为一体的新型表面分析仪器。它们的共同特点是能对以前无法观察到的材料表面(包括非生物材料和生物材料)纳米尺度的结构和性能进行成像和探索研究。原子力显微镜有接触式(CONTACT MODE)和轻敲式(TAPPING MODE)两种工作方式。其中轻敲式工作方式比较适合生物医学样品。目前,各大公司所销售的原子力显微镜,一般都配置有扫描隧道显微镜的功能³。

21世纪将是生命科学的世纪。当今生命科学已经从描述性、实验性科学向定量科学过渡。研究的焦点是生物大分子⁴,尤其是蛋白质和核酸的结构与功能的关系。纳米生物学是指在纳米尺度上研究生物的反应,包括修复、复制、调控方面的生物过程,以及对分子的操纵和改性为目的分子生物工程。由于可在大气或液体的自然状态直接对生物医学样品进行成像,分辨率又比较高,AFM已成为研究普通生物医学样品及生物大分子的理想工具之一。主要应用包括生物细胞的表面形态观测,生物大分子的结构及其它性质的观测研究和生物分子之间力谱曲线的观测等。

项目资助]“原子力显微镜分析技术方法体系的建立与应用”获2002年度国家科技部条财司分析测试新技术方法研究项目资助。科[2002-06]

2 原子力显微镜对生物细胞表面形态观测

一般认为,AFM能够在自然环境中直接观测生物样品的表面结构,而且避免复杂的制备过程,以及电子束辐射所带来的样品损伤。但实际情况并非完全如此。AFM对生物医学样品制备,同样也有一定的要求。包括:表面平整,高度起伏 $\leq 10 \sim 20 \mu\text{m}$;表面有一定的硬度;基底面平滑,如用新鲜解离的云母片等;对于较大的颗粒、细胞,可用盖玻片、塑料片等;样品在基底表面要求相对均匀、分散等。客观地讲,相对于电镜复杂的生物样品制备过程来说,原子力显微镜的生物样品制备过程要简单一些。但遗憾的是,没有一种普遍适用的方法,能够解决原子力显微镜所有的生物医学样品的制备问题。因此,一般情况下,都需要科研人员自己动手制备符合AFM技术要求的样品,以获得满意的观察效果。

游离细胞样品制备过程大致步骤如下:首先提取细胞,2.5%戊二醛固定;同时制备新鲜解离的云母片,用双面胶固定于基底表面;然后将固定细胞滴加于云母表面,用氮气吹干并展平;最后用接触式或轻敲式进行细胞的表面形态观测。

活的培养细胞样品制备过程大致步骤如下:事先将培养皿或盖玻片用多聚赖氨酸进行处理,然后将细胞培养于培养皿或盖玻片上,检查前将培养皿或盖玻片制成小于 $1 \times 1 \text{ cm}$ 的小片;将指甲油滴加于AFM液体池底部,小片的无细胞面沾到指甲油上,而小片的有细胞面上滴加培养液;待指甲油干后,液体池中充入培养液,置于AFM的扫描器上,即可进行细胞表面形态的成像观测。AFM对活体细胞的成像效果还很不理想,这主要是因为细胞膜表面比较柔软,与基底的固定较弱,探针的压力会使探针和细胞表面的接触面积大大增加,从而损伤细胞或造成细胞的漂移。

O'Reilly等⁵利用AFM对一定数量的红细胞表面形态及三维结构进行了观测和图像分析,从而得出细胞的厚度、宽度、表面积以及体积等量化参数。对于活细胞,也可以在AFM的液体池中进行动态的观察。通过液体池的进液孔可随时注入不同的化合物溶液,改变活细胞的液体环境(如离子浓度、pH值、温度、湿度等)进行动态的观测。Jena等⁶利用AFM对感染病毒后细胞表面形态的改变、造骨细胞在加入底物(钴铬、钛、钛钒等)后细胞形态和细胞弹性的变化、GTP对胰腺外分泌细胞囊泡高度的影

响进行研究。黄益民等⁷利用原子力显微镜对自由基损伤的红细胞膜表面精细结构研究,直接观察到了自由基的损伤,以及加女贞子保护后,对红细胞膜分子形貌学的影响。

如果要对一些生物医学组织样品进行AFM表面形态成像观测,样品制备过程大致如下:选取组织表面较为平整的部位,剪成 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$ 小块,观测面朝上,展平后贴在盖玻片上;滴加固定液于样品表面上,静置30 min左右;用三蒸水冲洗去固定液中的溶质所形成的结晶;将盖玻片置于AFM的扫描器上,进行成像观测。一般来说,组织样品进行AFM的表面形态成像效果还比较满意。

AFM观察细胞表面形态结构分辨率还不够理想。这主要是由于细胞膜表面太软,探针的压力(无论是接触式,还是轻敲式)会使探针和样品表面的接触面积增大,从而使分辨率降低。AFM观察细胞表面形态结构的分辨率一般只能维持在nm到 μm 之间。如果样品制备不好,仪器状况调整不佳,操作人员技术不够熟练,那么AFM的分辨率还要低一些。

3 原子力显微镜对生物大分子的结构及其它性质的观测研究

原子力显微镜目前已广泛应用于蛋白质、核酸、DNA、磷脂生物膜、多糖等生物大分子以及有机化合物在空气或溶液中的形态观测研究。张英鸽等⁸用AFM对乙酰胆碱酯酶分子进行显微成像。林璋、白春礼等⁹用AFM进行亚精胺诱导DNA凝聚有序性的研究。Rief等¹⁰用AFM研究了不同大小的力对单个葡聚糖分子的影响,其中可逆的构象变化已经得到分子动力学计算的证实。胡钧等¹¹进行了人工操纵病毒的原子力显微镜研究,首次实现了复杂的体系——一种线性噬菌体病毒的人工拉直与定向,并利用原子力显微镜对拉直前后的病毒进行了观察与测量。

用AFM对生物大分子进行形态结构观察时,样品制备也很重要。蛋白质样品制备过程有两种方法,一种是蛋白质吸附固定法:首先将云母裁成 $1 \times 1 \text{ cm}$ 的小片,用双面胶固定于AFM基底上,制备新鲜裂解的云母表面;将一定浓度的蛋白溶液滴加于云母表面,用氮气将其展平,吹干,蛋白便可吸附于云母表面;将液体池置于AFM的扫描器上,即可进行细胞表面形态的成像观测。该方法简便易行,可满足一般成像的要求。缺点是蛋白质固定不一定牢固,可能会出现脱落或拖动现象。另一种是蛋白

质共价固定法:利用蛋白质分子上的氨基与巯基丙酸的羧基形成肽键连接的原理,进行蛋白质的固定。该方法固定比较牢固。缺点是方法复杂,费时费力。固定好的样品置于 AFM 的扫描器上,即可进行生物大分子表面形态结构的成像观测。

如果是 DNA 类的样品,其制备过程大致如下:首先将根据实验目的,稀释原液;然后取适量稀释液滴加于新鲜裂解云母表面,氮气展平,吹干。固定好的样品置于 AFM 的扫描器上,即可进行生物大分子表面形态结构的成像观测。

目前,AFM 已广泛应用于对生理生化反应中蛋白质、核酸等生物大分子的形态或功能的动态研究。在此基础上还可以进行分子水平的热力学和动力学的研究。研究生物大分子的生理生化过程,是目前 AFM 在生命科学中应用最多的领域之一。配备了环境气氛箱的 AFM 可以在样品箱内进行气氛控制,样品调整以及样品观察。这样可以对生物大分子在各种不同的气氛(包括大气、低真空、各种气体置换、不同湿度和温度等条件)下的形态结构等进行研究。在这个领域里研究较多的主要有:蛋白的聚合、纤维组装的过程¹²、胶原的超微结构和组装、蛋白三维晶体增长的研究、生物膜的结构和生物物理特性的变化¹³、DNA 的装配过程以及生物大分子之间的交互作用¹⁴等。

4 原子力显微镜对生物分子之间力谱曲线的观测

用 AFM 对生物大分子进行形态结构观察的同时,还可对大分子的其它性质进行研究,如配体-受体之间作用力¹⁵、抗原-抗体之间的作用力¹⁶等。对生物分子表面的各种相互作用力进行测量是原子力显微镜的一个十分重要的功能。这对于了解生物分子的结构和物理特性是非常有意义的,因为这种作用力决定两种分子的相互吸引或者排斥,接近或者离开,化学键的形成或者断裂,生物分子立体构象的维持或者改变等等。在分子间作用力的支配下,还同时支配着生物体内的各种生理现象、生化现象、药物药理现象,以及离子通道的开放或关闭,受体与配体的结合或去结合,酶功能的激活或抑制等等。因此,生物分子间作用力的研究,在某种意义上说,就是对生命体功能活动中最根本原理的研究。这也为人们理解生命原理提供一个新的研究手段和工具¹⁷。

将两种分子分别固定于 AFM 的基底和探针尖

端上。然后使带有一种分子的探针尖端在垂直方向上不断地接近和离开基底上的另一种分子。这时,两种分子间的相互作用力,就是二者间的相对距离的函数。这种力与距离间的函数关系曲线,称之为力谱曲线。

对于作用力的测定,AFM 对生物医学样品的制备,同样也有一定的要求或必须具备一定的特点。即需要将研究的两种分子分别固定于基底和探针尖端表面,而且还要求固定相对牢固。因此,样品制备的难度比其他的要大的多。

以链抗生物素对尖端进行功能化处理为例,其过程大致如下:将 AFM 悬臂浸入乙酮 5 min,然后紫外线照射 15 min;在 37 的湿润孵化器中,悬臂浸入一滴 50 μ L 生物素-BSA(牛血清白蛋白),孵育过夜;用 PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)洗三次,除去非结合蛋白;室温下悬臂浸入一滴 50 μ L 链抗生物素中,孵育 10 min,在碱性环境中,使 BSA 吸附于悬臂;悬臂使用前,用 PBS 再冲洗三次即可。总之,将特定的配体或者受体固定于悬臂探针表面,将与之对应的受体或者配体固定于基底表面,在悬臂探针表面与基底表面相接近或者分离的过程中,悬臂受到偏折,从而测得两个功能化表面之间的作用力,即配体-受体之间的作用力。

通过对 AFM 探针进行功能化修饰,使针尖的表面带有特殊的官能团,用以识别存在于同一表面内的不同官能团,进行表面组分成像。它可以实现纳米范围内化学反应特性的研究。AFM 还可以实现同时对生物分子表面结构、作用力等的动态实时观测。如生物大分子的弹力、细胞壁的膨胀压力以及各种微粒之间的各种相互作用力等。近年来,在 AFM 基础上各种扫描力显微术发展很快,主要有静电力、摩擦力、磁力、剪切力等显微术。力对样品的表面性质很敏感,根据检测力的变化可以获得样品表面丰富的信息。

5 结论

AFM 自诞生之日起,在生物医学研究中就得到迅速发展,应用范围逐步拓展,在形态与功能相结合的研究中,极大的推动了生物学基础研究工作的前进。结合物理、数学等学科知识,为生物分子的功能与现象研究提供了理论依据。Touhami 等¹⁸利用 AFM 对红细胞扫描成像,并对红细胞表面抗原和特异性抗体之间的相互作用力进行了测量;James 等¹⁹在生理条件下对感染了寄生虫的细胞进行了连续扫

描成像,以观察感染的动态过程;Martin 等²⁰对固定在基底上的 DNA 蛋白复合物分别在空气和液体环境中成像,获得了不同构型复合物结构上的定量和定性信息,例如 DNA 长度,蛋白与 DNA 结合的位点等;Satoru 等²¹研究讨论了修饰在针尖上的蛋白在接近样品表面过程中和样品表面之间的作用力关系,以及影响蛋白吸附的各种因素;Tiina 等²²应用 AFM 在生理条件下观察 HELA 细胞肌动蛋白装配的动态过程。

随着 AFM 技术方法的不断完善,生产工艺及仪器性能的不断改进,AFM 在生物医学中的应用越来越广泛。染色体切割、DNA 特异性片段的提取和搬运原子的技术也在不断的进步,AFM 不仅成为一种重要的成像工具,同时也在显微操作中具有重要的应用价值。

AFM 独特的成像方式和具有 nm 水平的分辨率,使得它在众多科学领域中得到迅速的发展和广泛应用。例如金属、半导体材料、微电子、纳米材料、计算机材料²³、物理、化学、和生命科学等。总体上来说,国内目前在此方面的研究主要集中在中科院系统的少数科研单位,并以材料学研究为主。而原子力显微镜在生物医学中的应用,还处在初级阶段。在我国生物医学领域,电子显微镜很多,约 1000 台。而原子力显微镜却很少,约一二十台。少数原子力显微镜的部门或单位,所开展的研究工作也都比较初步,大都停留在一般细胞的表面形态观测上。发表在第四届到第六届全国 SIM(扫描隧道显微镜,是 AFM 的前身,统属 SPM 扫描探针显微镜)学术会议(1996~2000 年)上,有关生物医学的文章,总共只有 20 篇左右。发表在第七届全国 SIM 学术会议(2002 年,上海)上有关生物医学的文章约 32 篇,没有论及生物分子间相互作用力测定的文章。AFM 在生物医学中的应用还有许多问题急需解决。例如生物医学样品的制备,软生物样品的固定,分辨率的进一步提高,功能化探针的制备及基底表面的固定,针尖的几何形状及污染问题等。

近年来国内外研究表明,原子力显微镜在生医学研究中的应用具有很大潜力,它是在纳米分辨率下研究生命科学的一个有力工具。如果我们将细胞学、免疫学、生物化学、分子生物学、生物物理学等与原子力显微技术有机地结合起来,将 AFM 和其他仪器设备(如透射电子显微镜、扫描电子显微镜、激光共聚焦扫描显微镜、物质谱、核磁共振、X 射线晶体衍射等)有机地结合起来,相互补充、取长补短,一

定会获得很好的研究结果。可以预见,在不久的将来,AFM 作为一项独立的研究方法将日臻成熟,应用范围也将日渐扩大,并将对生命科学的发展做出重大的贡献。

参考文献

- 1 张亦奕,牟建勋,邵志峰等. 原子力显微镜在结构生物学中的应用,电子显微学报,1996,15(2~4):314~328
- 2 张德添,何昆,张飒等. 原子力显微镜发展近况及其应用,现代仪器,2002,(3):6~9
- 3 赵清亮,王景贺,李旦,董申等. 扫描探针显微镜的最新技术进展及应用,电子显微学报,2000,19(1):69~75
- 4 Zhifeng Shao, Jianxun Mou, Daniel M. Czajkowsky, Jie Yang and Jian - Yang Yuan et al. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. Advances in Physics, 1996, 45(1):1~86
- 5 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
- 6 Jena BP, Schneider SW, Geibel JP, et al. G regulation of secretory vesicle swelling examined by atomic force microscopy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(24):13317~13322
- 7 黄益民,李稼,白春礼等. 原子力显微镜对自由基损伤的红细胞膜表面精细结构的研究,北京生物医学工程,1999,18(1):18~23
- 8 张英鸽,王琛,赵德禄等. 乙酰胆碱酯酶分子的原子力显微成像 [J], 电子显微学报,1999,18(1):94~98
- 9 林璋,王琛,白春礼等. 亚精胺诱导 DNA 凝聚的有序性的 AFM 研究 [J], 电子显微学报,1999,18(1):106~110
- 10 Rief M, Oesterhelt F, Heyman B, et al. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy [J]. Science, 1997, 275(5304):1295~1297
- 11 胡钧等. 人工操纵病毒的原子力显微镜研究,生物化学与生物物理进展,1998,25(2):175~177
- 12 Kuznetsov YG, Malkin AJ, McPherson A. Self-repair of biological fibers catalyzed by the surface of a virus crystal [J]. Proteins 2001, 44(3):392~396
- 13 Rinia HA, Snel MM, van der Eerden JP, de Kruijff B. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy [J]. FEBS Lett 2001, 501(1):92~96
- 14 Stolz M, Stoffler D, Aebi U, et al. Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy [J]. J Struct Biol 2000, 131(3):171~180
- 15 Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. 1994:Science 264:415
- 16 Parbin BC et al: Probing recognition process between an antibody and an antigen using atomic force microscopy. Physico-chemical and Engineering Aspect(1998),143:53~57

- 17 张英鸽等. 用原子力显微技术测定生物分子之间的相互作用力, 生物医学工程学杂志 1998, 15(4): 424~428
- 18 A. Touhami, A. Othmane, O. Ouerghi. Red blood cells imaging and antigen/antibody interaction measurement. Biomolecular Engineering 19 (2002): 189/193
- 19 James A. vorak. The application of atomic force microscopy to the study of living vertebrate cells in culture. Methods 29 (2003): 86~96
- 20 Martin L. Bennink. Dynamic imaging of single DNA - protein interactions using atomic force microscopy. Analytica Chimica Acta 479 (2003): 3~15
- 21 Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda. Mechanistic aspects of protein/ material interactions probed by atomic force microscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23 (2002): 153~163
- 22 Tiina Lehto, Marta Miaczynska, Marino Zerial. Observing the growth of individual actin filaments in cell extracts by time - lapse atomic force microscopy. FEBS Letters 551 (2003): 25~28
- 23 路新春等. 软磁盘、硬盘的表面形貌和微摩擦特性, 清华大学学报·自然科学版 1998, 38(10): 5~8

The biomedical application of atomic force microscopy

Zhang Detian Zhang Sha He Kun Yang Yi Zhou Tao Zhang Yingge

(National Center of Biomedical Analysis, Institute of Pharmacology and Toxicology
No. 27, Tai Ping Road, Beijing 100850)

Abstract AFM is one of the most important development in the surface image techniques in the recent ten years. It showed high resolution to the level of nanometer. The basic principle of AFM and its application in biomedical area were reviewed in the paper, including the morphologic studies of cells and large moleculars, as well as monitoring biomolecular interactions. The preparation of biomedical specimen were also discussed.

Key words Atomic force microscope Resolution Biomolecules

网上仪器展览推出“仪器专场展示”

由中国分析测试协会主办、中国仪器仪表学会分析仪器学会协办、仪器信息网 (www.instrument.com.cn) 承办的网上仪器展览 (www.netshow.com.cn) 平台自开通以来, 受到广大业界人士的关注和欢迎, 大家足不出户, 即可查到所需仪器产品和厂商的详细资料。目前, 已有近 260 家国内外著名仪器厂商参展, 展出仪器 1500 多台 (含图片和详细文字介绍), 发布各类仪器应用文章 700 多篇。

为更好地帮助广大仪器用户在采购仪器时, 能进行充分地比较, 选到适合的仪器, 获取足够多的相关信息和知识, 网上仪器展览推出了“仪器专场展示活动”, 目前开设的仪器专场有:

气相色谱	紫外可见	GC-MS
液相色谱	原子吸收	LC-MS
离子色谱	近红外光谱	ICP-MS
薄层色谱	红外光谱	生物质谱
毛细管电泳	光电直读光谱	微波消解
核磁共振	原子荧光	甲醛分析仪
X射线衍射仪	X 荧光光谱仪	粒度分析仪
粘度计	拉曼光谱	硬度计

COD 测定仪	ICP-AES	材料试验机
BOD 测定仪	扫描探针显微镜	天平
热分析仪专场	电子显微镜	离心机
水分测定仪	红外气体分析仪	PCR
电位滴定仪	研磨机	冻干机
电导仪	热解析仪	气体发生器
生化培养箱	色差仪	纯水器

近期, 还将开出“水质分析”、“农药残留”、“土壤分析”等仪器专场。

每个专场将不同型号的同类仪器进行同步展示, 可任意选择两台仪器进行比较, 并将每台仪器的样本、应用文章也发布出来, 供大家参考, 免去了大家平时选购仪器须东西跑找资料之苦。并可在网上直接向厂商询价。

此外, 大家还可就每台仪器进行具体讨论交流。

此项活动的另一个目的是帮助广大分析工作者更好地了解仪器的最新进展, 掌握更多的仪器采购和仪器维护知识。

仪器信息网 www.instrument.com.cn 供稿