

文章编号:1004-7220(2012)03-0355-06

· 综 述 ·

原子力显微镜在细胞与生物大分子 超微结构和力学研究中的应用

朱 杰^{1,2}, 郭连红^{1a,3}, 王国栋^{1a}, 欧阳五庆^{1b}

(1. 西北农林科技大学 a. 理学院, 生物物理研究所, 心血管生物力学实验室; b. 动物医学院, 杨凌 712100;
2. 吉林大学 超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012; 3. 中南大学 公共卫生学院, 长沙 410078)

摘要: 作为微纳米科学理论与技术迅猛发展的代表,原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)在其25年的发展过程中极大地推进了生物学在微纳米尺度上的拓展,为微纳米生物学的诞生与发展提供了重要技术手段。本文在介绍 AFM 基本原理和检测模式的基础上,结合作者在该领域的研究成果和工作经验,从生物结构与形态学研究、表面物化性质表征、生物大分子的力学操纵三方面综述了 AFM 在细胞与生物大分子超微结构与生物力学特性研究中的具体应用,并重点探讨了 AFM 在细胞与生物大分子科学研究中亟待改进和解决的科学与技术问题,提出了一些探讨性的见解和建议。

关键词: 原子力显微镜;微纳米生物学;超微结构;物化特性;生物力学

中图分类号: Q 66 **文献标志码:** A

Application of atomic force microscopy in ultrastructure and biomechanics of cells and biomacromolecules

ZHU Jie^{1,2}, GUO Lian-hong^{1a,3}, WANG Guo-dong^{1a}, OUYANG Wu-qing^{1b} (1. a. Laboratory of Cardiovascular Biomechanics, Institute of Biophysics, College of Science; b. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China; 3. School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: To be the representative fruition resulted from the rapid development in micro-nano theory and technology, atomic force microscopy (AFM) has greatly promoted the expansion of biological research in micro-nano scale, and facilitated the birth and development of micro-nano biology as an important technique in its 25-year evolutionary progress. Based on the fundamental principles and detection modes of AFM, as well as the author's research findings and work experience in this field, the paper reviews the application of AFM in the study on ultrastructure and biomechanical properties of cells and biomacromolecules in the aspects of biological structure and morphology, surface physicochemical characterization and mechanical manipulation of biological macromolecules, and focus on some important scientific and technical problems on AFM in micro-nano biomedical research needed to be improved and solved urgently, with exploratory insights and recommendations for potential users in ultrastructure and biomechanics of cells and biomacromolecules.

Key words: Atomic force microscopy (AFM); Micro-nano biology; Ultrastructure; Physicochemical properties; Biomechanics

收稿日期:2011-07-07; 修回日期:2011-08-12

基金项目:中国博士后科学基金(20100481372),中央高校基本科研业务费专项资金项目(QN2011123),超分子结构与材料国家重点实验室开放课题(SKLSM201127),西北农林科技大学留学归国人员科研启动费(Z111020906)。

通讯作者:朱杰, Tel: (029) 87092226; E-mail: cardiaclabs@gmail.com。

细胞是组成生物体结构和功能的基本单位,是展现生命状态全部特点的最小实体,而细胞里的各种生物分子则对细胞的生存、繁殖和死亡起着重要作用。研究单细胞的超精细结构和各种物化性质,有可能解决细胞的个体功能和群体生理行为上悬而未决的问题。超微生物力学是应用力学方法和理论,从分子及其相互作用角度,研究各种细胞、亚细胞结构以及生物大分子的力学性质,探讨发生在细胞、细胞膜和核膜内,以及核酸和蛋白质中力学规律^[1]。1986年,Binnig等^[2]发明的原子力显微镜(atomic force microscope, AFM),放大倍数($\sim 10^9$ 倍)远远超过以往的任何显微镜,不仅可以高分辨率表征样品表面形貌,分析与作用力相应的各种表面性质,还能产生和测量电化学反应,并可对标本进行力学加工,实现染色体的切割、细胞膜的打孔等^[3]。AFM所需的样品前期处理很少,可在溶液中进行观测活的生物样品及其动态生理过程^[3];这些特性使AFM在细胞与生物大分子超微结构与力学特性研究中占据独特地位^[4]。

1 AFM在超微结构研究中的应用

样品表面的三维成像是AFM最基本的功能。由于表面的高低起伏状态能够准确地以数值的形式获取,经分析可得样品表面的粗糙度、颗粒度、孔结构和孔径分布等参数^[5],AFM可观察分子膜中分子的排列结构、取向及分子链的空间构象,这是一种可以准确提供局域分子堆积和膜表面缺陷信息的可靠方法。对小范围表面图像分析还可得到表面物质的晶形结构和聚集状态、分子的结构、面积和表面积及体积等^[6]。

1.1 细胞层次

用AFM可对游走上皮细胞的浆膜进行实时成像,实验研究活肾上皮细胞浆膜小斑上的细胞骨架元素、浆膜浅凹和膜结合丝。AFM研究显示,正常间皮细胞表面显示出精细的、长度可变的微绒毛;一些腺瘤细胞表现出了大小随凹痕而变化的分泌器官凸起;并明确了各种细胞表面在背景周围显露的颗粒状纹理,大多数来自于蛋白质在渗出液中的沉淀作用^[7]。Solletti等^[8]试图用AFM对非洲爪蟾卵母细胞膜成像,但仅看到卵黄膜和卵黄小板,其可能原因是该细胞膜上的微绒毛使细胞膜粗糙,且易变形,

从而在成像过程中使针尖不稳定。在接近生理条件下原位研究大鼠肝膜的隔离斑时,增加所用的扫描力,最上层膜可被剥离而暴露出细胞外表面缝隙连接的六边形阵列结构,其分辨率可达到3 nm。用AFM深入研究运动训练和药物对大鼠红细胞超微形态的影响发现,过度训练会导致红细胞的微缩,同时可能会出现少量的孔洞结构,而药物刺激则会使细胞表面出现医学显著的突起(见图1)。Braet等^[9]用AFM观察了自然杀伤性肝细胞和结肠癌细胞共培养时的细胞毒性实验。传统的细胞毒实验方法在效应细胞和靶细胞接触后1.5~3 h方可检测到细胞毒效应,而用AFM在两种细胞接触后10 min即可检测到。

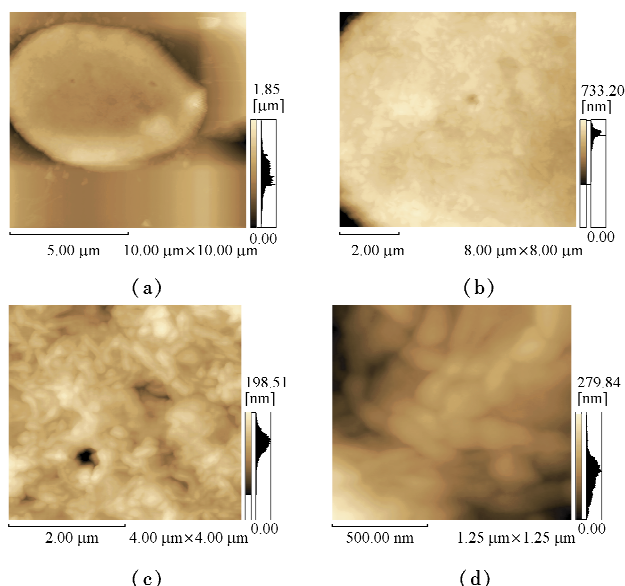


图1 运动训练和药物处理对大鼠红细胞超微形态影响的AFM拓扑图像 (a)~(c)过度训练会导致红细胞的微缩,并出现少量的孔洞结构;(d)药物(无训练)刺激使细胞表面出现显著突起

Fig.1 AFM topographies of the rat red blood cell treated with medicine and sports training (a)-(c) Pore structure and miniaturization appeared in overtraining group, (d) Protruding appeared on cell surface stimulated by drug

1.2 生物大分子层次

通过控制成像操作力的大小,AFM图像的可重复性高、现场操作性好,能够监测整个生化反应的动力学过程;载体的选择则更加简单,范围也更大。这些优点已使AFM成为这个领域的重要工具^[10]。AFM的出现对膜蛋白结构的认识提供了更广的空间。利用不同信噪比的AFM可对晶体膜蛋白的原

子结构、生理状态的膜蛋白成像,分辨率达到 0.1 nm。近几年用 AFM 对肺表面活性脂蛋白、钙调蛋白、精子膜蛋白、脱铁铁蛋白等多种膜蛋白进行了研究,并且在分子水平对结晶过程进行定量分析。随 AFM 探针技术的发展,最近对蛋白质这种生物大分子的研究已达到可以同时多种参数进行计量和测算的程度^[11]。应用 AFM 还成功地观察了肌动蛋白、血纤维蛋白原、免疫球蛋白等游离蛋白质分子。通过 AFM 对肌动蛋白聚合、解聚、破裂、弹性系数变化等过程的观察,进一步证实了肌动蛋白的网络结构对活细胞稳定性的决定作用。最近利用 AFM 对蛋白质三维晶体结构的研究也获得了极大进步。Tiner 等^[12]利用 AFM 观察到了三链 DNA(H-DNA)结构,并得到 H-DNA 与双链 DNA 的厚度明显不同,经过仔细测量发现 H-DNA 的结构与现有理论模型符合得很好。更大的核酸结构如核小体和染色体包括染色体定位、转录、转移和小分子 DNA 相互作用同样可用 AFM 来研究。将一定浓度的 DNA 溶液直接滴加到磷脂单分子层上,可以获得清晰的 DNA 图像,并用 SPM 分析软将测得 DNA 的初始高度约为 2.3 nm,该值与 DNA 链的理论值 2.1 nm 十分相近(见图 2)。Andrew 等^[13]观察到淀粉颗粒内部的纳米结构,发现玉米淀粉颗粒内部接近脐点的位置具有 400~500 nm 的生长环。蔡林涛等^[14]通过原子力显微镜直接观察虫草多糖分子的三维结构形貌,结果表明虫草多糖分子具有高度分枝的结构,并且糖链间形成小环或螺旋结构。

2 生物力学特性表征

AFM 的一种重要的测量方法是力-距离曲线,根据针尖与样品材料的不同及针尖-样品距离的不同,针尖-样品作用力可以是原子间斥力、范德瓦耳斯吸引力、弹性力、黏附力、磁力和静电力,通过分析这些作用力,就能够了解样品表面区域的各种力学性质如压弹性、黏弹性、硬度等^[15-16]。利用电力显微镜可了解膜表面电势、介电常数和沉积电荷等;另外,还可通过探针与膜上组装分子的结合拉伸了解物质分子的拉伸弹性、聚集状态或空间构象等物化属性;若用蛋白受体或其他生物大分子对探针进行修饰,探针则具有特定的分子识别功能,从而了解组装脂膜表面分子的种类与分布情况。

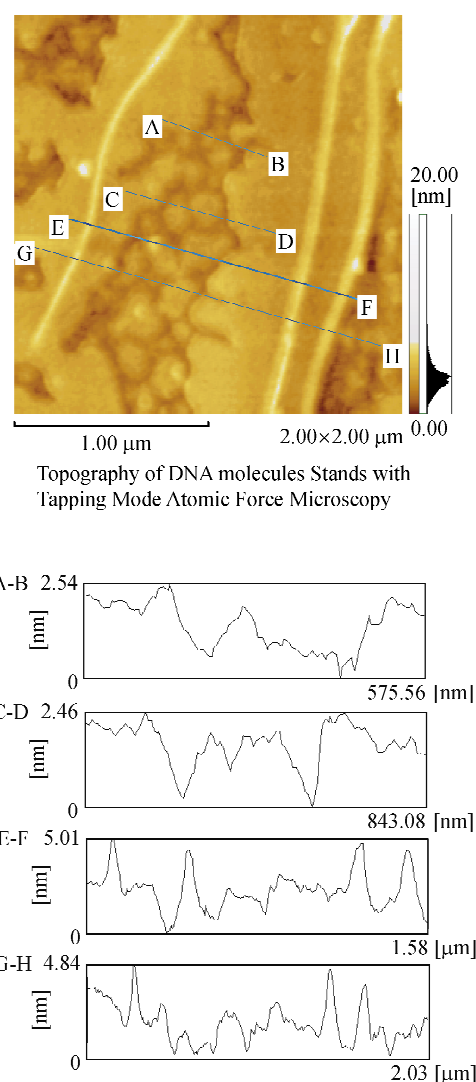


图 2 新鲜解理云母上磷脂单分子层及 DNA 分子的 AFM 拓扑图像
Fig.2 AFM topography of the single molecular PC layer and the DNA molecule on newly cleaved mica

2.1 静电力学特性

用 AFM 测量静电作用最常用的方法是连续统一体 DLVO 理论^[17]。当两个表面分开几纳米时,补偿表面电荷的离子云便开始交叠,导致两个表面间渗透压的产生。在十分短的距离内,吸引性范德瓦耳斯力取代了排斥性的静电双层(EDL)力。因此,如果缓冲溶液的电解质成分和 pH 值已知,渗透压的标准指数衰减便适于揭示物体的表面电荷密度^[18]。AFM 探针也可作为缓冲溶液中探测生物样品表面电荷的传感器,这样带电探针与生物样品表面带电区域间的 EDL 力能转换成 AFM 的拓扑结

构图像,并通过缓冲溶液中电解质的浓度及 pH 值的大小来进行调节^[19]。为了在实验上描绘通道蛋白 OmpF 的静电势,人们用高分辨率 AFM 研究了各种不同静电条件下的试样表面电荷分布。蛋白通道的表面静电势通过在不同静电贡献条件下减去 AFM 拓扑成分便可进行分解,静电势代表用不同静

电贡献的拓扑图经计算而得到的图谱^[20]。实验结果清晰地显示出 OmpF 在孔道入口处建立了负的静电势,这一静电势随着电解质浓度的减少而不断增加(见图 3),这为实时动态研究生物样品的动力学过程提供了强有力的工具^[20]。

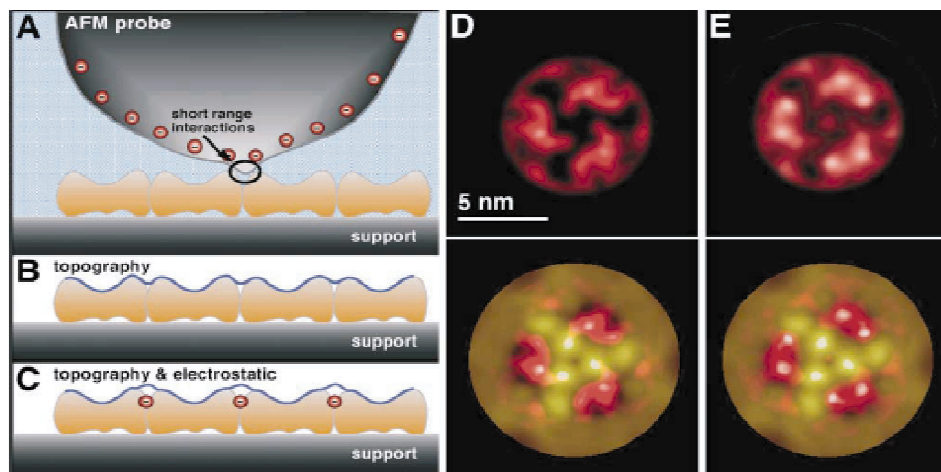


图3 原子力显微镜绘制 OmpF porin 通道的静电势^[32]

Fig.3 Static electronic potential of the OmpF porin with atomic force microscopy

2.2 黏弹力学特性

生物大分子在微小外力的作用下会发生构像甚至功能的变化,单分子弹性的研究将有助于揭示其结构与功能之间的动力学关系,这种作用力决定两种分子的相互吸引或排斥、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,并介导生物体内的各种生理现象、生化现象、药物药理现象以及酶功能的激活或抑制等。根据简单模型得到的生物分子间作用力需经过理论计算进行推断,其结果太理想化,因而很难真实反映生物分子的实际状况,同时也无法动态反映生物体内的分子运动过程。而利用 AFM 可实时测量生理状态生物样品分子间的作用力的动态变化,如化学基团间的作用力、受配体作用、DNA 互补链和核苷碱基间的氢键、运动蛋白质间的相互作用等,进而综合研究生理环境中的各种生物样品的微观性质^[21]。对于单分子,一个重要方面是研究单个分子之间的作用力,这也是联系单个分子和结构性质的一个重要桥梁。利用分子间相互作用高度局域性,研究功能团分子间相互作用、生物大分子方面的相互作用等,逐渐形成了以化学性质

识别为特色的显微方法。

2.3 力学操纵

蛋白分子的折叠结构已为人们所熟知,而对于这种折叠结构的稳定性以及折叠结构形成的推动力的直接研究仍然很少见。蛋白的折叠结构,尤其是分子内折叠结构,对于其许多生理功能的实现具有重要作用。许多机械蛋白的链内都包含有靠分子内相互作用形成的多个独立的结构域。由于蛋白折叠的能量形貌是未知的,蛋白的力学性质或折叠机理无法从热力学分析中得到。通过将蛋白的两端分别连接于 AFM 的针尖和基底之间的力操纵,人们可以直接检测到该结构域的力学稳定性。AFM 成像与操纵的联合研究允许其能够在宏观尺度直到单分子尺度上对生物系统进行精确和可控的修饰。结构学、化学和形态学研究显示,S-层是生物进化过程中最为原始的一种膜结构,它们完全掩盖了细胞的表面。实验结果显示,S-层晶格的完整性可通过弱键力不同程度的结合得到维持,但这些弱键力比那些粘于下层细胞膜成分的结合力要强一些。用 AFM 对 HPI-层的内表面成像可以获得聚集体间相互作

用的认识。通过周期缩进 AFM 探针, HPI 内层表面与氮化硅探针间将形成 6 个较强的黏附力峰值。这一现象显示, 将探针与 HPI 层连接起来的分子结构很可能由近 N 端的疏水序列片断所介导, 该 N 端本身便带有被认为与外膜作用的烃基部分。记录力曲线后再对 HPI 层进行成像可对其上粘滞力用结构变换来进行校正。当从膜组装体上连续移除蛋白单聚体时, 整个 HPI 六聚体也在每一个力峰处断续地失掉其亚基, 从而完成对蛋白分子的力操纵和力谱测量^[22-23]。

3 亟需解决的问题

AFM 优秀的时空分辨率能力使得生物样品能在生理条件下被观测; 作为一种力检测与操纵技术, AFM 在细胞与生物大分子领域的应用前景非常广阔, 但同时也面临着巨大的技术挑战。

3.1 探针针尖的污染问题

决定 AFM 分辨率和功能关键的探针是容易受损和被污染的。当探针极细的尖端被损坏时, AFM 的分辨率将会大幅度下降, 这样就无法获得样品的超精细结构图像, 从而使 AFM 功能大打折扣; 在近距扫描时, 由于探针与样品间的作用力, 样品成分很容易粘在探针针尖上, 从而使针尖变粗或出现多个探针的现象, 这时 AFM 扫描可能会出现许多假象, 极易给人的判断带来困难。解决上述问题的唯一办法就是依靠 AFM 操作者的经验判断。作者在长期的 AFM 操纵过程中总结了大量有关 AFM 假象的实验现象, 并尝试对假象出现的缘由给出了一定程度的解释^[24], 最主要的是必须考虑样品表面和探针的力学特性与相互作用的稳定性。

3.2 仪器的稳定性与可靠性

AFM 的接触模式与非接触模式的表面测定结果相似, 而扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电镜 (TEM) 的测定值都偏小。造成这种偏差的原因可能是由测定方法所决定的, 这些对试样的预先处理都会带来测量上的偏差。在膜表面结构和形态的观察中还发现, 膜的操作环境同样会对测量结果产生影响, 但 AFM 却可在大气和液体环境中对膜表面进行成像扫描, 从而减小了环境的影响。同时, AFM 并非全自动的生产线, 需要在测试时努力调整各种测试参数以求 AFM 处于稳定态, 进而达到最好结

果。与其他仪器一样, AFM 在展现其优点的同时, 其缺点也是显而易见的, 这对 AFM 结果的可靠性提出了极大的挑战。由于 AFM 在机械设计上的限制, 当前 AFM 的测量参数和范围还很有限, 在现阶段多种仪器的联用可能是解决这一问题最为直接的途径。荧光共振能量转移技术能够在 2 ~ 8 nm 范围内测量分子相对位置的改变, 该技术与 AFM 成像技术联用可能会产生新的应用, 从而输出更多的量化数据, 这些途径允许单分子间的作用和功能变换能在不同环境下进行表征。另外, 由于现有 AFM 探针设计的物理局限性, 急需引入新的设计概念以使 AFM 在高时空分辨率下对生物系统的构象变化和动力学过程进行实时观测。

3.3 功能的开发问题

AFM 的基本物理原理是很成熟的, 但科学不等于技术, 仪器在运行时许多技术问题还有待更多更深入的理论去解释, 如探针针尖附近的流体力学问题、探针-样品间的力场研究等。AFM 技术的进一步突破还依赖于稳定激光系统的研制、微悬臂系统的制作、压电换能器材料的探索、光电二极管技术的改进; 同时也与电子线路、传动马达系统、防震防噪声系统的设计与完善密切相关; 另外, 计算机技术的进步和数据处理软件的开发更是不可忽视的关键因素。但生物学家却面临着更大的困难, 他们必须熟悉显微镜的工作原理及其应用, 以检测从细胞到单分子的热学、化学、电化学、弹性学和电子学特性。这一交叉领域要求学者对分子生物学、生物化学、生物物理学、表面科学等领域有着高度的熟悉程度^[25]。

致谢: 感谢 Argonne 国家实验室 Irving 教授、Pritzker 研究所 Orgel 教授、吉林大学张文科教授的探讨。

参考文献:

- [1] Axelrod D. Lateral motion of membrane proteins and biological function [J]. J Mem Biol, 1983, 75(1): 1-10.
- [2] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope [J]. Phys Rev Lett, 1986, 56(9): 930-933.
- [3] Zhu J. Application of AFM to nano-imaging and nano-manipulation [J]. Nanosci Technol, 2005, 3(3): 33-37.
- [4] Hansma PK. Tapping model atomic force microscope in liq-

- uids [J]. Appl Phys Lett, 1994, 64(13): 1738-1740.
- [5] Zhu J, Sun RG. Application of AFM to the structure and function of single cell [J]. Life Sci Instrum, 2005, 3(2): 15-19.
- [6] Raposo M, Ferreira Q, Ribeiro PA. A guide for atomic force microscopy analysis of soft condensed matter [J]. Mod Res Educ Top Microscopy, 2007, 2: 758-769.
- [7] Chang L, Kiouss T, Yorgancioglu M, *et al.* Cytoskeleton of living unstained cells imaged by scanning force microscopy [J]. Biophys J, 1993, 64(4): 1282-1283.
- [8] Solletti JM, Kasas S, Bertrand D, *et al.* AFM and SEM [J]. J Sci Tech B, 1994, 3: 1535-1539.
- [9] Braet F, Vermijlen D, Bossuyt V, *et al.* Early detection of cytotoxic events between hepatic natural killer cells and colon carcinoma cells as probed with the AFM [J]. Ultramicroscopy, 2001, 76(4): 265-267.
- [10] Zhu J, Qi H, Sun RG. Application of AFM in single molecular science [M]. Beijing: Science Press, 2005, 13: 220-235.
- [11] Engel A. Atomic force microscope: A powerful tool observes biomolecules at work [J]. Trends Cell Biol, 1999, 9(2): 77-80.
- [12] Tiner WJ Sr, Potaman VN, Sinden R, *et al.* The structure of intramolecular triplex DNA: Atomic force microscope study [J]. J Mol Biol, 2001, 314(3): 353-358.
- [13] Andrew A, Baker M, Miles J, *et al.* Internal structure of the starch granule revealed by AFM [J]. Carbohydrate Res, 2001, 330(2): 249-256.
- [14] Cai LT, Li P, Lu ZH. Observation of the structure morphology of cordyceps polysaccharide by atomic force microscope [J]. J Chin Electron Microsc Soc, 1999, 18(1): 103-105.
- [15] Müller DJ, Harald J, Tiina L, *et al.* Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM [J]. Prog in Biophys Mol Biol, 2002, 79(1-3): 1-43.
- [16] Müller DJ, Kurt A. Biomolecular imaging using atomic force microscopy [J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(8s): 45-49.
- [17] Israelachvili J. Intermolecular & surface forces [M]. London: Academic Press Limited, 1991: 1-115.
- [18] Butt HJ. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope [J]. Biophys J, 1991, 60(6): 1438-1444.
- [19] Butt HJ. Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a SFM [J]. Biophys J, 1992, 63(2): 578-582.
- [20] Muller DJ, Baumeister W, Engel A. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* imaged by atomic force microscopy [J]. J Bacteriol, 1996, 178(11): 3025-3030.
- [21] Boland T. Direct measurement of hydrogen binding in DNA nucleotide base by atomic force microscope [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(12): 5297-5299.
- [22] Ishijima A. Sub pico-newton force fluctuation SOF auto myosin in vitro [J]. Nature, 1995, 352: 301-302.
- [23] Heinaw F. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the AFM [J]. Trends Biotechnol, 1999, 17(4): 143-150.
- [24] Zhu J, Sabharwal T, Guo L, *et al.* Effects of probe pollutants on morphological and mechanical measurements of muscle and collagen fibers using AFM [J]. Scanning, 2010, 32(3): 113-121.
- [25] 杨力, 李良. 天然-人工合成聚合物混合纳米纤维在生物医学领域中的应用 [J]. 医用生物力学, 2011, 26(2): 105-108.
- Yang L, Li L. Application of mixed natural-artificial synthetic polymer nanofibers in biomedicine [J]. J Med Biomech, 2011, 26(2): 105-108.