

原子力显微镜在分子细胞生物学研究中的应用

朱 杰

1986年秉霖(G. Binnig)等在扫描隧道显微镜的基础上发明了原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)。这种显微镜的放大倍数远远超过以往的任何显微镜,可以直接观察物质的分子和原子组成,这为微观世界的探索提供了理想的工具。AFM不仅可以以高分辨率表征样品表面形貌,分析研究与作用力相对应的各种表面性质,并可对样品的分子或原子进行纳米级力加工,也能对活的生命样品进行实时动态观测。这些特性使AFM在生命科学特别是在分子细胞生物学的研究中占据着独特的地位。

一、AFM对细胞表面结构的研究

AFM的样品制备简单,只需作一个渗涂片并在空气中干燥,且不需特殊的染色和固定;它的放大倍数和成像分辨率都远远高于其他显微镜。AFM已广泛用于观察各种活细胞或固定细胞的表面结构,获得了丰富的信息。在大气环境下,通过AFM可清楚地观察到红细胞静止状态下的大小和形状,同时红细胞的各种量化参数均可被测算。

用AFM观察血小板的运动,可看到微丝结构、颗粒传输到细胞质外侧及活化中细胞成份的再分配。实验观察到淋巴细胞仅有很少几处凸起,而巨噬细胞显示出比较模糊的吞噬细胞凹,甚至观察到巨噬细胞正在吞噬粒细胞。用AFM可对游走上皮细胞的浆膜进行实时成像,实验研究了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。常琳等用AFM观察水中活的或固定的哺乳动物细胞表面骨架结构,在活细胞中可实时跟踪研究细胞构形的变化及由于引入药物所致细胞骨架结构表面受体的交联等;另外,AFM还可描述细胞骨架力的变化。AFM研究显示,正常的间皮细胞表面显示出精细的长度可变的微绒毛;一些腺癌细胞表现出了大小随凹痕而变化的分泌器官凸起;变质的间皮瘤细胞缺乏细胞膜;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。

二、AFM对细胞生理过程的研究

利用AFM可对液态环境中的活细胞进行动态的观察,这就使得观察结果更加真实可靠。电化学溶液池、专用培养皿和带有温控、湿控、气控设备的环境箱可为细胞的生理状态下的动态观察提供仿真的环境。试验利用直径小到足以插入活细胞内而又不严重干扰细胞的正常生理过程的探针,去获得在不同环境条件下能反映整体功能的活细胞内的动态信息。

AFM可以在生理状态下观察细胞的生长过程、骨骼细胞的动态变化、活细胞的三磷酸腺苷(ATP)活化和病毒对细胞感染过程;AFM也可检查细胞表面的缓慢运动、细胞膜对探针针尖的反应;研究纤维蛋白原的聚合作用、细胞外基质的构成、微丝的运动及核孔的形态等等。普特曼等用AFM研究了生理条件下的细胞生长过程。卡萨斯等用AFM观察常规规

状态的监测;用于夜间侦察、夜间监控和安全防范等方面;由于技术的发展和价格的下降,在民用方面也被广泛应用。如夜间摄像和天文观测等方面。

特殊环境摄像机的主要用途

高温电视 常用来监视高炉、炼钢和各种加热炉。

水下电视 水下电视是海洋开发和水下工程必不可少的探测工具,水下电视绝大多数是供水深在300m以内的大陆架使用。主要应用于水中资源的调查;水中土建工程检查;在特定水域设置鱼网及人工鱼礁的实际情况进行调查,鱼群探测等;沉

船的打捞;水下建筑设施的定期检查。

随着现代科学技术的发展,应用电视的使用范围越来越广,从军事方面的电视制导、微光电视夜间侦察系统,工矿专用的高温、防爆、水下作业等特种监视系统,医疗检查用的X线电视,红外电视,交通用的交通监控、指挥系统,以及无处不在的保安电视监控,几乎每一个行业,每一个生活角落都有应用电视。

(娄底市湖南人文科技学院通信与控制工程系 417000)

冲液中活细胞的动态变化,直到实验结束,细胞仍然存活,不影响细胞的继续生长。撒萨克等用 AFM 研究了培养液中小鼠活成纤维细胞的弹性。在长达 2 小时的连续观察中,发现细胞不断皱缩,弹性不断改变。这些研究都表明了 AFM 可用于细胞生理过程的动态观察。

三、AFM 在生物大分子研究中的应用

AFM 可以在空气或各种溶剂中直接观测生理条件下的生物大分子,这是其他化学和物理分析方法所无法比拟的;通过控制成像操作力的大小,图像的可重复性大大提高;现场操作性好,能够研究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。这些优点已使原子力显微镜成为这个领域的重要工具。

蛋白质 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 可对晶膜蛋白的原子结构、生理状态的膜蛋白成像,三维分辨率达到 $0.5 \times 0.5 \times 0.1$ 纳米。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。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。如对肌动蛋白的观察,早期用 AFM 获得的图像中可看到 5 纳米高隆起的肌动蛋白分子结构,随探针技术的不断改进观测到了肌动蛋白分子的螺旋构造,现今用轻敲模式不仅观测到 70 纳米长的 D 带区,就连区内的亚结构也能观察。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。

脱氧核糖核酸 从林德赛首次用 AFM 获得脱氧核糖核酸的图像以来,AFM 已经成为研究核酸分子结构的重要工具。1992 年,布斯塔曼特等用 AFM 在室温和干燥空气条件下得到质粒 DNA 的图像,图像重复性良好且分辨率达到了分子级水平;另外,可以清晰地观测到三维环状 DNA 分子的结构,并可估算分子的宽度和高度。汉斯玛等在丙醇体系用轻敲模式研究小片断 DNA 和双链 DNA 的分子结

构,得到分辨率 2 纳米的高清晰度图像。以上两个实验是 AFM 研究生物大分子的两个重大突破。很多学者用 AFM 对 DNA 结构进行了后续研究,有人观察在不同的湿度下 DNA 构型的变化,如 A- 型、B- 构型、Z- 构型等。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。

多糖 吉埃蒂纳等用 AFM 观察了曲霉皂脚葡萄糖淀粉酶上淀粉结合区域两结合位点间的相互作用。蒂曼妥夫等用原子力显微镜修饰了玻璃基底上的果胶和淀粉混合层,并对其进行了观测。冈宁等用原子力显微镜在分子水平上对直链淀粉进行了观测,AFM 图像揭示了样品扩展链状分子的分布情况,同时也首次对一些支链大分子进行了直接的观察。李黎希等将单层碳纳米管浸于纯化的马铃薯直链多糖水溶液中,随后用原子力显微镜观察固化混合物中的碳纳米管,可观察到碳纳米管被多糖螺旋包裹。赖斯洛等系统地研究了各类淀粉颗粒表面的拓扑形貌,发现玉米淀粉和木薯淀粉的颗粒表面比马铃薯淀粉颗粒表面要平滑。安竺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 纳米的生长环。蔡林涛等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。

四、AFM 在生物学领域的应用前景

在生物学领域,AFM 以其分辨率高、样品制备简便、制样过程对样品原始形态影响小、能在生理条件下进行动态研究等优点备受青睐。后基因组即蛋白质组的研究已提上日程,想要了解蛋白质的功能首先要了解其结构,AFM 提供了这样一个平台;作为一种观测手段,AFM 可通过对肿瘤细胞的形态来判断肿瘤的类型与属性,从而起到肿瘤诊断作用;作为一种改造手段,AFM 可对被观察标本直接进行纳米级的人工操作,以达到对病理细胞进行手术的目的,这样便有可能对肿瘤进行治疗。虽然到目前为止,AFM 研究中还存在针尖污染、针尖对样品的影响等不利因素,但随着物理理论和材料科学技术的发展,它将会在生命科学领域发挥更大作用。

(西安陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理研究室 710062)