

网络出版时间: 2021-3-19 10:45 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1522.032.html>

应用原子力显微镜对细胞及亚细胞结构的研究进展

孙玉婷¹ 综述 鲁春雁², 王欢¹, 韩毅敏¹, 闫永达³ 审校

摘要 原子力显微镜(AFM)是以原子级别的高分辨为特征的新型探针显微镜,其原理是利用微悬臂尖端探针与受测样品原子之间的作用力进行检测,具有原子级的分辨率,能够精确、快捷地实现在细胞及分子水平上的生物体系观察,自问世以来已迅速地在生物医疗领域的各方面得到广泛应用。该文通过对近年来国内外相关论文的广泛阅读并分析,以实验环境的选择、细胞与亚细胞结构检测的特性和 AFM 衍生技术的应用进展为方向展开了总结和探讨,为以 AFM 技术应用动态监测细胞及细菌、病毒生理活动的研究提供一些思路和有益参考。

关键词 原子力显微镜;检测环境;衍生技术;标本制备方法
中图分类号 Q 24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0667-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.033

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是一种具有原子级别高分辨率的新型探针显微镜。与一般的扫描电子显微镜相比,AFM 分辨率更高(横向扫描分辨率达 0.1~0.2 nm,纵向扫描分辨率达 0.01 nm)、使用的工作环境更宽松(同时可在真空、大气和液体环境中作业)。并且,通过 AFM 进行检测的标本不需要进行蜡块包埋和固定处理,这对于在缓冲液或空气环境进行细胞、微生物及亚细胞结构的动态研究具有条件优势^[1]。其自 1986 年被发明以来迅速地运用于生物医学领域,并已成为领域内重要的观察、研究工具,多用于 DNA 的分子构象、蛋白质和 DNA 分子动态行为的研究以及活细胞表面及亚细胞结构形貌变化的观察^[2],其工作原理^[3]。该文搜集中外近年来 AFM 运用于细胞及亚细胞结构研究的成果,展开分析和总结,作一综述。

2020-06-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:51675134)

作者单位:¹哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇科,哈尔滨 158000

²阿勒泰人民医院妇科,阿勒泰 836000

³哈尔滨工业大学精密工程研究所,哈尔滨 158000

作者简介:孙玉婷,女,硕士研究生;

韩毅敏,女,博士,教授,副主任医师,责任作者,E-mail: qingshe3925282@163.com

1 样本处理和实验环境的选择

在记录活细胞机械特性和其生物活动的实验中,需要在无菌条件下进行,可避免水分蒸发,保持培养基温度和气体的稳定性,从而避免 AFM 扫描陶管的热漂移现象。David et al^[4]通过微扰实验将质量波动、ATP 合成和水运输等细胞过程联系起来,研究显示 AFM 需在无菌条件下记录细胞活动,记录细胞质量的变化。Willner et al^[5]在应用 AFM 技术对 DNA 进行研究时,表明 DNA 的制备需要在液体环境中进行,同时在温度范围为 15~85 °C 的环境中进行单链 DNA 混合,并且发现整合的标记物片段需经 AFM 确认,因此,最终在液态环境中应用 AFM 技术对 DNA 片段进行检测,并记录了运动轨迹,从而得到 DNA 在纳米尺度中的折纸运动情况。Casuso et al^[6]为了确定膜蛋白的相互作用及作用途径,应用 AFM 对细胞运动中的膜蛋白进行表征时,其实验环境为 PBS。

上述研究表明,亚细胞结构可以在液体环境中进行各项生理活动,同时针对探针对亚细胞结构的研究,需要在液体环境中制备样本,并且通过在培养液中加入不同的引物、反应物和酶等模拟细胞生活环境,从而更容易得到真实状态下亚细胞结构的生物反应。因此,相较于其他检测方法,在液态环境中应用 AFM 技术对标本进行检测具有更大的优越性。应用原子力显微镜对细胞及亚细胞结构进行检测时,通常选用金刚石类探针,但此类探针细小且易损伤细胞,在实验过程中可以通过环氧树脂胶水将微球黏于无针尖探针,从而获得微球胶体探针,实验可以根据检测物的特性对胶体探针进行针对性加工^[7]。综上所述,应用该方法对活细胞进行实验时,可以降低探针细胞的损伤,但现有研究无法证明此类探针亚细胞结构的影响是否达到预期效果。

2 应用 AFM 对细胞及亚细胞的研究成果

2.1 AFM 针对细胞的研究进展 AFM 不仅能够提供超光学极限的细胞结构图像,还能够探测细胞

的微机械特性,同时利用 AFM 研究细胞很少用样品预处理,尤其能够在近生理条件下对之进行研究。利用 AFM 还能够对固定的活细胞和亚细胞结构进行深入研究,这些研究获得了有关细胞器的构造、细胞膜和细胞骨架等更详细的信息,同时将细胞固定在基底上再进行 AFM 观察,还可以得到层状脂肪物、微端丝和微绒毛等特征^[8]。见图 1。

应用 AFM 对人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)进行检测,刘玉乔等^[9]研究表明微丝贯穿细胞长轴并与应力纤维平行,起压力作用,牙周膜细胞(hPDLFs)波形丝蛋白阳性,角蛋白染色阴性。在进行妇科相关肿瘤检测时,高洪菲等^[10]对卵巢癌细胞及宫颈基底细胞的检测应用了 AFM 技术,其可对细胞机械结构及形态学进行检测,印证生物结构与生物学特性的相关性,并且通过实验表明,人卵巢癌细胞存在细胞核明显增大、细胞轮廓突出和细胞两端存在类吸盘样结构等特点,并且宫颈鳞癌细胞核常为裸核,细胞质平均高度为 2 μm 。由于微丝参与机械力引起的多种生理活动,然而微丝是否参与相邻细胞间自噬信号的传递还不清楚,刘林^[8]利用 AFM 的高分辨成像和精准控制力优势,观察了微绒毛和微绒毛簇的动态变化。

2.2 AFM 对亚细胞结构的研究 在亚细胞结构中,细胞核的结构最复杂,这是因为其内蕴含了大量的生物遗传物质,其中 DNA 染色质的暴露和遮盖对基因的表达和调控产生很大的影响,并且可以通过 AFM 观察到 DNA 在纳米层面上的折纸运动、离子调控下 DNA 亚型的互相转换及四联体的形成过程^[11](图 2)。核小体是染色质的基本结构单位,利

用 AFM 分析核小体的列阵及分子动力学,可以获得单个分子染色质纤维上核小体动力学的直观图像,同时可以观察到核小体核心粒子的滑动过程和组蛋白粒子的解离过程,其中组蛋白的解离存在两种方式,即组蛋白八聚体解离和四聚体的顺序解离,而核心粒子的滑动则是在 DNA 链中以 50 nm 范围波动^[12]。Murat et al^[13]通过实验表明了平板内核小体的定向不规则性,并且在相邻层间的核小体存在相互交错时,在 TEM 下观察到利用块状染色质存在有组织的多层板状结构,同时发现在 5 种不同中期染色体中观察到核小体的 DNA 结果一致。

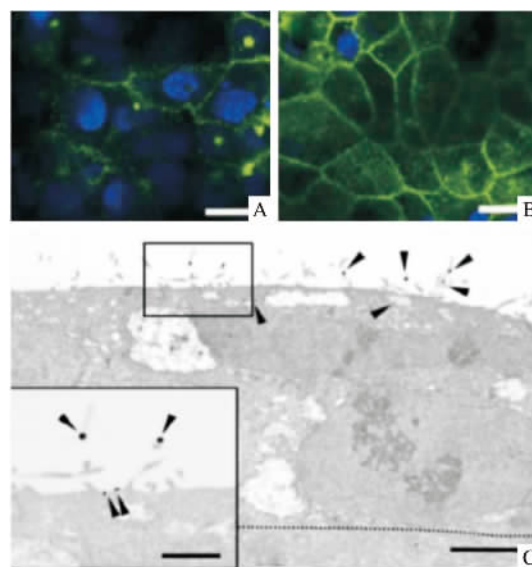


图 1 细胞表面微绒毛变化

A: 对照组; B: 流体剪切力作用; C: 免疫荧光电镜对细胞葡萄糖转运蛋白多糖的定位

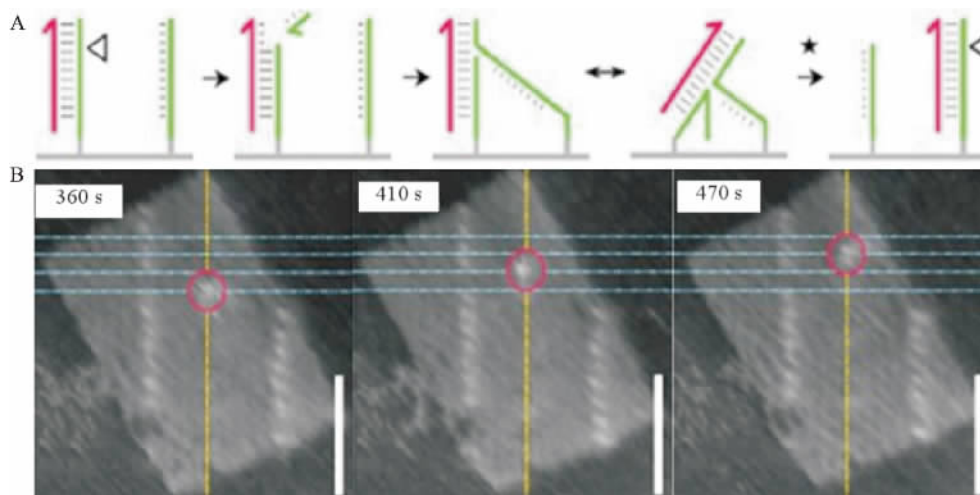


图 2 DNA 分子折纸上的轨道运动

A: DNA 分子折纸轨迹示意图; B: AFM 捕捉到了 DNA 分子折纸运动

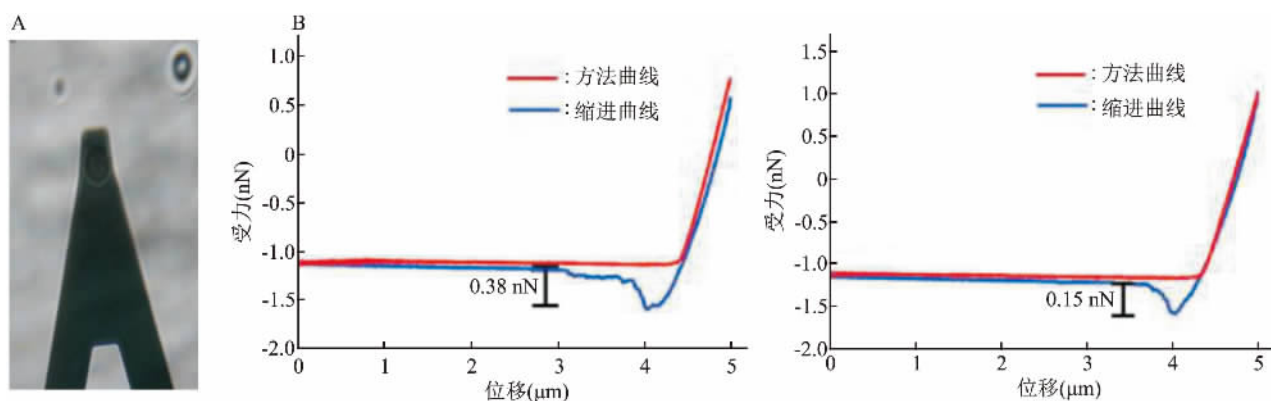


图3 用单细胞力谱测量 Raji 细胞与 rituximab 涂层衬底间的黏附力

A: 控制单细胞探针在利妥昔单抗涂层衬底上进行接近-驻留-收缩运动的光学图像; B: 测量过程中记录的代表力-距离曲线

以上研究解释了染色体的条带和拉伸染色体后观察到条带分裂的原因。G-四链体作为端粒中高度稳定的二级结构决定了端粒的稳定性和活性,可以应用 AFM 对端粒活性及 G 四链体的稳定性进行评定^[14]。同时 AFM 也可以对细胞膜及其他亚细胞结构的机械学、形态学特点进行捕捉和分析。通过 AFM 记录表明,在单细胞运动过程时,许多原代病毒粒子吸附于细胞表面而不进入细胞内部,子代病毒通过细胞内双膜中间体释放病毒的机制感染细胞,并与细胞膜融合,排出病毒,Ruan et al^[15]通过实验表明,膜畸变只与加载力有关而不随着时间发生改变。程洁^[16]在小鼠诺如病毒(MNV)感染细胞试验中通过 MNV-1 感染甲基化 β -环糊精和动态蛋白,以检验感染是否被抑制,从而证明了细胞膜结构域中脂筏是该病毒的入口。细胞膜转运蛋白在局部细胞的生命活动中起到了决定性作用,以神经纤维为例,谷氨酸转运蛋白是神经传导的基础,类蛋白转运物在与细胞膜结合的过程中膜升高 1.8 nm,从形态学及机械学改变上证实了转运蛋白和细胞膜间的作用^[17],应用 AFM 可以检测某些生物大分子的生理作用,还能够观察到凝血因子 VIII 与磷脂膜的相互作用,记录钙离子改变结构域的过程^[18]。Yang et al^[19]在对亚细胞结构进行检测时,观察了微绒毛结构变化产生的影响,发现微绒毛可以影响细胞对 FITC-葡聚糖的吸收能力,并且可以通过改变外部环境诱导微绒毛形成,从而引起葡聚糖吸收增多的现象发生。

综上所述,由于细胞核中包含了大量的遗传物质,将 AFM 技术应用于亚细胞机构的检测,可以观察到细胞核内 DNA 的运动,为基因的表达和调控提供技术指导。

3 应用 AFM 衍生技术研究细胞及亚细胞结构的进展

近年来,随着 AFM 在生物学领域的广泛应用,

越来越多的原子力显微镜衍生技术应运而生。原子力单分子力谱技术(AFM-SMFS)是指对回退曲线(力-扫描管位置变化曲线)进行分析,从而得到各类分子物理学特性的力学分析方法,利用该技术不仅可以探测分子内部力学变化,还可以对生物大分子的作用进行研究。Islam et al^[20]研究表明 AFM-SMFS 可供小分子配体进行强度筛选,并且选择性作用于 G 四联体结构的小分子配体,改变了分子构象,为开发新型药物奠定基础,同时有望在未来开发有效的新型抗癌药物。

将细胞附着在 AFM 探针的悬臂上,然后使用细胞探针直接接触细胞,测定探针与底物(生物材料或细胞)之间的黏附作用,这种方法称为单细胞力谱(AFM-SCFS)^[21]。单细胞力谱可以对细胞表面受体-配体间的相互作用进行检测,并且可以测定淋巴瘤细胞(Raji 细胞)与利妥昔单抗之间的黏附力,党丹等^[22]研究表明在一定浓度范围内,随着利妥昔单抗浓度增加,二者之间黏附力也随之增加,并且当浓度超过 60 mg/L 时,黏附力基本保持不变,同时研究表明该实验可对 Raji 细胞间的黏附力进行量化(图 3)^[22]。AFM-SCFS 广泛应用于细胞表面的受体-配体间的相互作用,应用 AFM-SCFS 已经检测了膀胱癌细胞与内皮细胞 CAM-1 之间的黏附作用,同时发现通过增加底物表面积可以提高 AFM 单细胞黏附测量的当量^[23]。

快速原子力显微镜(HS-AFM)是指短时间(通常为 100 ms)记录细胞的活动过程,该技术已经成功记录了 DNA 变构重组、酶作用下的分子马达运动和细胞膜部分生理活动等细胞活动^[24-25]。HS-AFM 形成图像的准确性与测量面积本身无关,其取决于微悬臂探针有效带宽所对应的速度,只要保持扫描速度小于带宽速度,就可以保证所记录微结构表面的真实性。AFM 可与表面增强拉曼光谱联合应用,

目前已经对某些蛋白酶结构和细胞膜结构域的作用机制进行了深入研究,同时还可利用纳米机器人对 AFM 图像进行分割处理^[26-27]。

4 总结

AFM 是一种具有原子级别高分辨的新型探针显微镜,作为一项新兴技术,目前已经成功用于检测微观粒子的物理特性,并且已经广泛应用于医疗领域。将原子力显微镜应用于研究细胞及亚细胞结构,可以从细胞结构、细胞活动过程到 DNA 的复制折叠等各个方面进行深入研究。研究表明应该及时针对样本的生物学特性选择适合的研究环境,并且对细胞和亚细胞结构进行微观探究,使得对生命活动有了更深刻的认识。AFM 衍生技术可以对蛋白结构进行构型设计和改造,有望在未来得到针对性极强的新型抗癌药物。

随着科学技术的发展,AFM 可以针对不同实验目的调整实验环境,对标本进行不同处理,并根据需要人为创造具有针对性的生物活性物质,在未来 AFM 将成为动态监测细胞活动、亚细胞结构动态变化和病毒细菌生理活动的主导者。

参考文献

- [1] 田永梅. 利用原子力和超分辨光学显微镜研究细胞膜结构 [D]. 长春: 中国科学院长春应用化学研究所, 2014.
- [2] 刘林, 魏余辉, 刘文静, 等. 快速原子力显微镜技术在细胞生物学中的应用新进展 [J]. 南方医科大学学报, 2018(8): 931-7.
- [3] 于凉云, 张奇, 袁淑军. 原子力显微镜 (AFM) 应用于纳米科学中的研究进展 [J]. 山东化工, 2016, 45(24): 39-43.
- [4] David M M, Gotthold F, Benjamin G, et al. Inertial picobalance reveals fast mass fluctuations in mammalian cells [J]. *Nature*, 2017, 550(7677): 500-5.
- [5] Willner E M, Kamada Y, Suzuki Y, et al. Single-Molecule observation of the photoregulated conformational dynamics of DNA origami nanoscissors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(48): 15324-8.
- [6] Casuso I, Khao J, Chami M, et al. Characterization of the motion of membrane proteins using high-speed atomic force microscopy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(8): 525-9.
- [7] Shinto H, Hirata T, Fukasawa T, et al. Effect of interfacial serum proteins on melanoma cell adhesion to biodegradable poly(L-lactic acid) microspheres coated with hydroxyapatite [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 1(108): 8-15.
- [8] 刘林. AFM 研究微绒毛、细胞膜微丝骨架及应用 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海应用物理研究所), 2019.
- [9] 刘玉乔, 王亚宇, 史亮. 生理状态下人牙周膜成纤维细胞的原子力显微镜下的观察 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2018, 28(9): 19-22, 32.
- [10] 高洪菲, 韩毅敏. 妇科肿瘤细胞的不同制备手段对 AFM 分析结果的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(5): 421-3.
- [11] Endo M, Sugiyama H. Single-Molecule imaging of dynamic motions of biomolecules in DNA origami nanostructures using high-speed atomic force microscopy [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(6): 1645-53.
- [12] Stumme-Diers M P, Stormberg T, Sun Z, et al. Probing the structure and dynamics of nucleosomes using atomic force microscopy imaging [J]. *J Vis Exp*, 2019, 31(143): 58820-33.
- [13] Murat P, Singh Y, Defrancq E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(11): 5293-307.
- [14] Aybeke E, Belliot G, Lemaire S, et al. HS-AFM and SERS analysis of murine norovirus infection: involvement of the lipid rafts [J]. *Small*, 2017, 13(1): 1600918.
- [15] Ruan Y, Miyagi A, Wang X, et al. Direct visualization of glutamate transporter elevator mechanism by high-speed AFM [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(7): 1584-8.
- [16] 程洁. 基于原子力显微镜的凝血因子 VIII 界面取向研究 [D]. 上海: 中国科学院上海应用物理研究所, 2019.
- [17] 刘良臣, 宋振亚, 廖子健, 等. AFM 对细胞膜蛋白分子黏附力研究, 中国力学学会: 第十届全国生物力学学术会议暨第十二届全国生物流变学学术会议论文集 [C]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [18] 刘艳辉. 原子力显微镜 (AFM) 与生物膜相互作用实验理论分析 [D]. 贵州: 贵州大学, 2006.
- [19] Yang Y, Goetzfried M A, Hidaka K, et al. Direct visualization of walking motions of photocontrolled nanomachine on the DNA nanostructure [J]. *Nano Lett*, 2015, 15(10): 6672-6.
- [20] Islam M K, Jackson P J, Rahman K M. Recent advances in targeting the telomeric G-quadruplex DNA sequence with small molecules as a strategy for anticancer therapies [J]. *Future Med Chem*, 2016, 8(11): 1259-90.
- [21] Taubenberger A, Cisneros D A, Friedrichs J, et al. Revealing Early steps of $\alpha 2 \beta 1$ integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(5): 1634-44.
- [22] 党丹, 项荣武, 刘斌, 等. 基于 AFM 单细胞力谱技术的淋巴瘤细胞黏附力测量 (英文) [J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(1): 89-98.
- [23] Laurent V M, Duperray A, Rajan V S, et al. Atomic force microscopy reveals a role for endothelial cell CAM-1 expression in bladder cancer cell adherence [J]. *Plos One*, 2014, 9(5): e98034.
- [24] Uchihashi T, Iino R, Ando T, et al. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase [J]. *Science*, 2011, 333(6043): 755-8.
- [25] Allsopp R C, Lalo U, Evans R J. Lipid raft association and cholesterol sensitivity of P2X1-4 receptors for ATP: chimeras and point mutants identify intracellular amino-terminal residues involved in lipid regulation of P2X1 receptors [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(43): 32770-7.
- [26] Charoenwattanasatien R, Tanaka H, Zinzus K, et al. X-ray crystallographic and high-speed AFM studies of peroxiredoxin 1 from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Acta crystallogr F Struct Biol Commun*, 2018, 74(2): 86-91.
- [27] 童麟, 韩越兴, 小长谷明彦. DNA 机器人在 AFM 图像中的分割和识别 [J]. 计算机工程与应用, 2019, 55(11): 192-8, 220.