

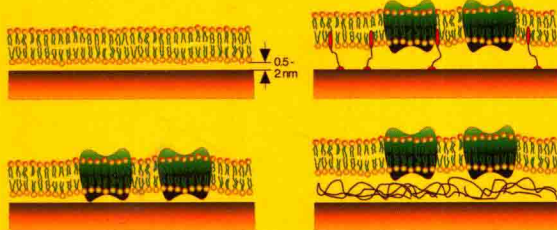
原子力显微镜 及其生物学应用

【英】V. J. 莫里斯

【英】A. R. 柯尔比 著

【英】A. P. 冈宁

钟 建 译



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

原子力显微镜及其生物学应用

[英] V. J. 莫里斯

[英] A. R. 柯尔比 著

[英] A. P. 冈宁

钟 建 译



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

内容提要

本书共9章,内容涵盖原子力显微镜的设备介绍、使用方法及其相关的应用研究领域,既包含了原子力显微镜技术的基本原理,又探讨了其应用在不同生物组织系统中的关键问题。

本书适合从事与原子力显微镜技术相关的如生物学、材料学、食品科学等领域的技术人员、科研人员及相关专业的师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

原子力显微镜及其生物学应用/(英)V.J.莫里斯
(Victor J. Morris), (英)A.R.柯尔比
(Andrew R. Kirby), (英)A.P.冈宁
(A. Patrick Gunning)著;钟建译. —上海:上海交
通大学出版社,2019
ISBN 978-7-313-16884-9

I. ①原… II. ①V… ②A… ③A… ④钟… III. ①原
子力学—显微镜—应用—生物学 IV. ①TH742②Q

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第088134号

Atomic Force Microscopy for Biologists

by Victor J. Morris, Andrew R. Kirby, A. Patrick Gunning

Copyright © 2009 by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd All rights reserved. This book, or parts thereof, may not be reproduced in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or any information storage and retrieval system now known or to be invented, without written permission from the Publisher.

Simplified Chinese edition arranged with World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore.

This translation published under license

上海市版权局著作合同登记号 09-2018-182

原子力显微镜及其生物学应用

著 者:[英]V.J.莫里斯 A.R.柯尔比 A.P.冈宁

出版发行:上海交通大学出版社

邮政编码:200030

印 制:上海万卷印刷股份有限公司

开 本:710 mm×1000 mm 1/16

字 数:450千字

版 次:2019年6月第1版

书 号:ISBN 978-7-313-16884-9/TH

定 价:168.00元

译 者:钟 建

地 址:上海市番禺路951号

电 话:021-64071208

经 销:全国新华书店

印 张:24

印 次:2019年6月第1次印刷

版权所有 侵权必究

告读者:如发现本书有印装质量问题请与印刷厂质量科联系

联系电话:021-56928178

译者序

原子力显微镜是扫描探针显微镜家族的一员,是由斯坦福大学的 Gerd Binnig 与 Calvin F. Quate 和 IBM 硅谷研究室的 Christoph Gerber 于 1985 年合作发明的。它可以在纳米级别上对各种样品(包括生物样品等)的形貌、力学性能、分子分布等进行探测,并且可以直接对样品进行纳米级加工。因此,原子力显微镜广泛应用于生物医学、医学科学、材料科学、表面科学和纳米科学等领域。原版书是原子力显微镜在生物学应用方面的经典著作,自 1999 年首次出版以来反响良好,并于 2010 年第二次修订出版。原版书的三位著者 Victor J. Morris, Andrew R. Kirby, A. Patrick Gunning 均在著名的英国 Quadram 生物科学研究所(原食品研究所)工作,都是国际著名的原子力显微镜生物学应用(特别是食品)专家。

原版书的特点是三位著者均有丰富的原子力显微镜生物应用经验,且他们在同一个单位进行紧密合作,因此原书系统、全面地对原子力显微镜生物学应用进行了详细的阐述,包括设备、原理、基本流程、针对不同生物系统的应用、与其他设备的联用、力谱技术等。既在理论上有深度,又注重应用实践的详细描述,具有很好的实用性。相比于无机或者有机样品,生物样品具有自己的独特特点,如样品尺度从分子到细胞再到组织,样品软且容易损伤,需要观察活细胞等。因此,应用原子力显微镜从事生物研究时需要进行更为全面、深入的考虑。然而,国内有关原子力显微镜生物学应用的著作基本没有,原版书中译本的出版无疑填补了这方面的空白。本书具有系统性强、内容全面、注重实际等特点,译者相信它对于我国的有关专业人员会起到启迪思路、开阔视野的作用,并且能为生物科学(包括食品科学)专家进入该领域时提供指导,有望缩短他们的学习时间。

本书由钟建(上海海洋大学副研究员、硕导)翻译与统稿。丁梦真(上海海洋大学硕士生)和王盼盼(上海海洋大学硕士生)参与了本书

的文字校对和参考文献整理等工作,在此表示感谢。译者特别感谢上海市“食品科学与工程”高原学科(上海海洋大学)和开放大学团队建设横向项目(E-6005-00-0039-13)的经费支持。最后,译者感谢上海交通大学出版社武晓雁、张潇等编辑的辛勤工作。

尽管译者具有十多年的原子力显微镜生物应用实践经验,但仍然由于译者知识水平有限,加上时间仓促,译稿中的不妥之处,竭诚欢迎广大专家学者批评斧正。

上海海洋大学食品学院
农业部水产品加工副产物综合利用技术集成科研基地
国家淡水水产品加工技术研发中心(上海)
上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心
钟 建

E-mail: jzhong@shou.edu.cn

本书献给 Martin Murrell 和 Mark Welland, 他们向我们介绍了探针显微镜技术, 从而使我们随后愉快地花了很多时间深入钻研 AFM 工作。另外要献给 Christina, Gloria 和 Yvonne, Ellie 和 Alex, 在写作这本书的过程中他们付出了充分的耐心和理解。

纪念“Ginny” Annison 和 Christopher Gunning。

目 录

1 绪论	1
2 仪器	4
2.1 原子力显微镜	4
2.2 压电扫描器	6
2.3 探针和悬臂	8
2.3.1 悬臂的几何形状	8
2.3.2 探针针尖的几何形状	10
2.3.3 探针针尖功能化	12
2.4 样品架	12
2.4.1 液体样品池	12
2.5 检测方法	13
2.5.1 光学检测: 激光束偏移	13
2.5.2 光学探测器: 干涉测量	15
2.5.3 电子探测器: 电子隧道	15
2.5.4 电探测器: 电容	17
2.5.5 电探测器: 压电悬臂	17
2.6 控制系统	18
2.6.1 AFM 电子	18
2.6.2 电子操作	19
2.6.3 反馈控制回路	21
2.6.4 设计限制	22
2.6.5 提高大扫描器的性能	23
2.7 振动隔离: 热和机械	23
2.8 校准	24
2.8.1 压电扫描器的非线性特性	25

2.8.2	探针相关因素: 卷积效应	25
2.8.3	校准标准	26
2.8.4	扫描校准样品的探针针尖	27
2.9	整合型原子力显微镜	28
2.9.1	联用 AFM-光学显微镜	28
2.9.2	“潜艇 AFM”——联用 AFM-Langmuir 槽	29
2.9.3	联用 AFM-表面等离子共振技术	29
2.9.4	冷冻 AFM	30
	参考文献	30
3	基本原理	33
3.1	力	33
3.1.1	范德瓦尔斯力和力-距离曲线	33
3.1.2	静电力	35
3.1.3	毛细管力和黏附力	35
3.1.4	双层力	37
3.2	成像模式	37
3.2.1	接触直流模式	38
3.2.2	交流模式: 轻敲模式和非接触模式	38
3.2.3	偏转模式	43
3.3	成像类型	44
3.3.1	形貌	45
3.3.2	摩擦力	45
3.3.3	相位	45
3.4	基底	46
3.4.1	云母	47
3.4.2	玻璃	47
3.4.3	石墨	47
3.5	一般问题	47
3.5.1	热漂移	47
3.5.2	多针效应	48
3.5.3	“泳池”伪像	49
3.5.4	高反射样品上的光学干扰	49
3.5.5	样品粗糙度	50

3.5.6	样品流动性	51
3.5.7	液体中成像	51
3.6	开始	52
3.6.1	DNA	52
3.6.2	麻烦的大样品	54
3.7	图像优化	56
3.7.1	灰度级和彩色表	56
3.7.2	亮度和对比度	56
3.7.3	高通和低通滤波	56
3.7.4	归一化和平面拟合	56
3.7.5	去尖	57
3.7.6	傅里叶过滤	57
3.7.7	相关平均	58
3.7.8	立体图和浮雕	58
3.7.9	做好你的功课	58
	参考文献	59
4	大分子	60
4.1	成像方法	60
4.1.1	针尖黏附、分子损伤和推移	60
4.1.2	将大分子沉积在基底上	60
4.1.3	金属涂层样品	62
4.1.4	在空气中成像	62
4.1.5	非水性液体成像	63
4.1.6	将分子与基底结合	63
4.1.7	在水或缓冲液下成像	66
4.2	核酸(DNA)	68
4.2.1	DNA 成像	68
4.2.2	DNA 构象、大小和形状	69
4.2.3	DNA-蛋白相互作用	74
4.2.4	特定站点的定位和绘谱	77
4.2.5	染色体	79
4.3	核酸(RNA)	81
4.4	多糖	82

4.4.1	多糖成像	83
4.4.2	大小、形状、结构和构象	84
4.4.3	聚集体、网络和凝胶	90
4.4.4	纤维素,植物细胞壁和淀粉	95
4.4.5	蛋白多糖和黏蛋白	100
4.5	蛋白质	102
4.5.1	球状蛋白	102
4.5.2	抗体	107
4.5.3	纤维蛋白	108
	参考文献	112
5	界面系统	167
5.1	界面介绍	167
5.1.1	表面活性	167
5.1.2	界面系统 AFM 研究	170
5.1.3	Langmuir 槽	170
5.1.4	Langmuir-Blodgett 膜转移	171
5.2	样品制备	172
5.2.1	清洁方案:玻璃器皿和槽	172
5.2.2	基底	174
5.2.3	浸渍	175
5.3	磷脂	175
5.3.1	早期磷脂膜 AFM 研究	176
5.3.2	AFM 修饰磷脂双层	177
5.3.3	AFM 研究双层内在性质	179
5.3.4	磷脂双层中的波纹相	181
5.3.5	混合磷脂膜	184
5.3.6	支撑层的影响	186
5.3.7	磷脂层的动态过程	188
5.4	脂质体和完整的囊泡	192
5.5	脂质蛋白混合膜	193
5.5.1	磷脂双层的高分辨率研究	197
5.6	混杂脂质/表面活性剂膜	198
5.7	界面蛋白膜	198

5.7.1 具体注意事项	198
5.7.2 界面蛋白膜的 AFM 研究	200
参考文献	204
6 有序大分子	211
6.1 三维晶体	211
6.1.1 结晶纤维素	211
6.1.2 蛋白质晶体	212
6.1.3 核酸晶体	214
6.1.4 病毒和病毒晶体	215
6.2 二维蛋白晶体: 介绍	218
6.2.1 AFM 必须提供什么	218
6.2.2 样品制备: 膜蛋白	220
6.2.3 样品制备: 可溶性蛋白质	220
6.3 二维膜蛋白晶体的 AFM 研究	222
6.3.1 紫膜	222
6.3.2 缝隙连接	224
6.3.3 光合蛋白膜	226
6.3.4 肾膜中的 ATP 酶	227
6.3.5 OmpF 孔蛋白	227
6.3.6 细菌 S 层	228
6.3.7 噬菌体 $\phi 29$ 头尾连接子	231
6.3.8 膜动力学的 AFM 成像	232
6.3.9 膜蛋白的力谱	234
6.3.10 气体囊泡蛋白	234
6.4 可溶性蛋白质二维晶体的 AFM 研究	235
6.4.1 成像条件	237
6.4.2 静电考虑	238
参考文献	240
7 细胞、组织和生物矿物	250
7.1 成像方法	250
7.1.1 样品准备	250
7.1.2 力绘谱和机械测量	252

7.2	微生物细胞: 细菌, 孢子和酵母菌	261
7.2.1	细菌	261
7.2.2	酵母	269
7.3	血细胞	269
7.3.1	红细胞	270
7.3.2	白细胞和淋巴细胞	272
7.3.3	血小板	272
7.4	神经元和神经胶质细胞	273
7.5	上皮细胞	275
7.6	非融合肾细胞	276
7.7	内皮细胞	277
7.8	心肌细胞	278
7.9	其他哺乳动物细胞	280
7.10	植物细胞	283
7.11	组织	286
7.11.1	嵌入切片	287
7.11.2	无嵌入切片	287
7.11.3	水合切片	288
7.11.4	冷冻-断裂复制品	289
7.11.5	免疫标记	289
7.12	生物矿物	290
7.12.1	骨、肌腱和软骨	290
7.12.2	牙	291
7.12.3	外壳	292
	参考文献	293
8	其他探针显微镜	310
8.1	概述	310
8.2	扫描隧道显微镜	310
8.3	扫描近场光学显微镜	313
8.4	扫描离子电导显微镜	314
8.5	扫描热显微镜	316
8.6	光镊和光子力显微镜	317
	参考文献	320

9 力谱	321
9.1 原子力显微镜的力测量	321
9.2 力谱的第一步:从原始数据到力-距离曲线	322
9.2.1 定量悬臂位移	322
9.2.2 确定悬臂弹性常数	323
9.2.3 力-距离曲线分析	325
9.3 拉伸方法	327
9.3.1 分子的固有弹性特性	327
9.3.2 分子识别力谱	331
9.3.3 化学力显微镜(CFM)	335
9.4 推压方法	335
9.4.1 胶体探针显微镜(CPM)	335
9.4.2 如何制作胶体探针悬臂组件	337
9.4.3 变形和压痕方法	340
9.5 力-距离曲线分析	341
9.5.1 蠕虫状链和自由连接链模型	341
9.5.2 分子相互作用	343
9.5.3 变形分析	345
9.5.4 剥离时的黏合力	345
9.5.5 变形时的弹性压痕深度(δ)和接触半径(a)	346
9.5.6 零载荷时的接触半径	346
9.5.7 胶体力	347
参考文献	348
扫描探针显微镜(SPM)相关参考书籍	356
索引	358

1 绪 论

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是扫描探针显微镜(scanning probe microscope, SPM)家族中的一员,其应用广泛。扫描探针显微镜主要通过“感受”标本而不是通过“观看”来形成图像。这种新型成像模式的放大倍率范围包括了光学显微镜和电子显微镜的放大倍率范围,光学显微镜通常是在“自然”成像条件下进行的。在自然条件下,分子水平或者亚分子分辨水平实时成像的生物系统是生物学家所感兴趣的。因此,自从扫描探针显微镜开发以来,吸引了众多生物学家和生物物理学家将其应用于生物学研究。关于 AFM 的研究论文最早发表于 20 世纪 80 年代初,之后 SPM 的生物应用发展极为快速。本书的目的之一是分析研究这些技术对生物科学的影响,并尝试去评估其未来的应用潜力。

扫描探针显微镜技术始于 20 世纪 80 年代初 Binnig 和 Rohrer 发明的扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM),它彻底改变了传统的显微镜技术。该发明的重要性迅速被大家所公认,发明人获得了 1986 年诺贝尔物理学奖。STM 是不断成长的大 SPM 家族的第一位成员。SPM 主要通过针尖扫描样品表面、测量探针与样品表面的某些作用形式来感受样品表面的结构。STM 的发展起源于在薄绝缘层电性能的研究,进而开发了通过测量导电表面和导电探针之间的隧穿电子来检测探针和样品表面距离的 SPM 设备。几年之后(1986 年),Binnig 和同事们宣布了 SPM 家族的第二个成员——原子力显微镜(也命名为扫描力显微镜,scanning force microscope)的诞生。在 20 世纪 80 年代后期,商业化 STM 已成为可能。20 世纪 90 年代初商业化 AFM 开始出现,到目前为止已经经历了几代的演变。改良型和新型 SPM 已经出现,且在未来将继续发展。生物研究中的重要进展包括力显微镜与光学或电子显微镜等的联用,冷冻原子力显微镜、扫描离子电导显微镜和扫描近场光学显微镜。

严格意义上讲,SPM 不是显微镜,它们主要采用尖锐的针尖来“触摸”或者感觉表面来观察样品表面。传统(远场)显微镜主要通过收集透过样品或从样品表面反射的辐射来成像。其最终的分辨率依赖于辐射波长的衍射极限。因此,传统光学显微镜的分辨率受限于 200 nm 左右。而在电子显微镜(electron microscope, EM)中可以通过使用高能电子而获得更高分辨率的生物材料图像。尽管最近环境

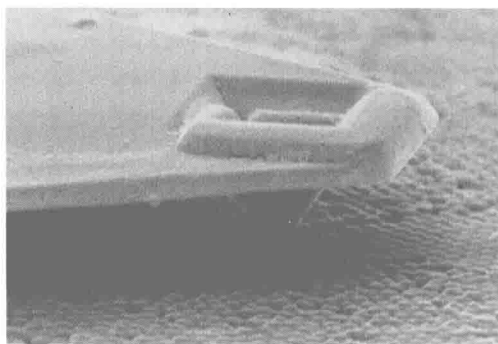


图 1.1 用于探测样品表面结构的 AFM 探针针尖的扫描电子显微镜图像(探针“触摸”样品表面,放大倍数约为 10 000x,图片由 Paul Gunning 提供)

以及样品相对于探针定位的准确度。利用 SPM 观察平坦表面可以实现“原子级”分辨率,且能够在气体或液体环境实现。对于大分子而言,原子级分辨率仅可以在观察每个原子都与平坦基底表面紧密接触的简单分子时实现。然而,SPM 能够实现“自然”条件下的大多数生物聚合物的亚分子级分辨率。SPM 具有观察自然或者生理条件下分子过程的能力,其能够在光学显微镜学家熟悉的实验条件下提供与大多数商业化电子显微镜同级别的分辨率。

最初的生物学研究是通过 STM 进行的。随着样品表面和探针间距的增加,隧道电流呈指数衰减。探针-样品间距上原子尺寸的变化将导致隧道电流的数量级变化。这意味着在针尖上最接近样品表面的原子发生了隧道效应,从而探针表现出像原子级尖锐一样的行为。因此 STM 可提供 SPM 家族中最高的分辨率。然而,隧道电流的快速衰减使得 STM 只能用于薄界面或单个生物聚合物的研究。对于较大的生物系统来说,探针-样品间距太大,从而隧道电流太小而无法检测到。此外,样品表面需要导电,这通常意味着需要涂覆生物样品,这就抵消了 SPM 方法(STM)的主要优点。然而,AFM 对于样品大小没有上述的限制,且 AFM 能够并已经对自然状态下从单个分子到细胞再到组织的不同尺寸范围的生物样品进行成像。原子力显微镜及其改进后的产品如低温原子力显微镜已经成为生物学研究中首选的 SPM 方法。早期,SPM 被认为是非侵入性技术。在实践中,样品的损坏和推移影响了 STM 和 AFM 的早期应用。对这些问题的理解和解决推进了可靠和可重现的成像方法的发展。研究重点也从显微镜的验证转移到生物学问题的研究。

其他类型的 SPM 已经用于生物学研究并且将发挥越来越重要的作用。一个可能的候选者且目前已经商业化的是扫描离子电导显微镜(scanning ion conductance

型电子显微镜的开发取得了新的进展,但仍然要求样品在真空或部分真空下进行检验来获得分子级别的分辨率。电子显微镜已经开发出许多卓越的制备方法来保持生物材料的“天然”结构。采用不同机制(见图 1.1)和不同标准的扫描探针显微镜的分辨能力也不同。

扫描探针显微镜技术是在探针扫描下方的样品表面时通过测量探针与样品表面之间相互作用的大小变化来获取图像的。因此,图像的分辨率取决于探针针尖的尖锐度或者表观尖锐度,

microscope, SICM), 本书中将讨论其基本原理及合适的生物学应用。人们越来越重视 AFM 与传统光学或共聚焦显微镜联用, 或者与其他表面技术如表面等离子共振技术等联用, 本书也将讨论部分显微镜联用技术。早期的显微镜联用技术与独立原子力显微镜相比受限于分辨率, 然而, 最新代的联用技术提供了联用光学显微镜来定位和表征生物样品的多用途性且具有与独立 AFM 相同的分辨能力。对于软样品(如细胞)仍然很难获得高分辨图像, 而最新的扫描离子电导显微镜以及远场和近场光学显微镜的进展都是有力的竞争者。随着探针显微镜技术的成熟, 重点已经从仅仅获取图像转变为更普遍地使用该技术来解决生物学中的问题。越来越多的探针显微镜被视为研究生物系统的工具箱, 应用范围包括有诸如弹性、摩擦、电荷等参数的整体绘谱, 表面的特定亲和力绘谱以及使用探针显微镜来修饰和操纵生物系统。逐渐地, 在自然条件下单分子水平测量的能力也与 AFM 成像应用受到同等重视, 应用范围包括单个分子的表征, 分子相互作用及它们在分子和细胞水平摩擦以及黏附中的作用。本书将聚焦于 AFM 的生物学应用, 评估该技术的优点和局限性。这一领域的文献是极为广泛的并且是出版迅速的, 本书不可能引用关于特定主题所有的已发表论文。相反, 我们试图引用图书、最近的综述和部分研究论文。用这些论文来强调某一点, 或提供一条通往该领域文献的路径。对于这些文献的选择并不意味着优先, 文献遗漏纯粹是由于时间和空间限制, 并不代表对这些出版物质量的评价。

我们希望这本书要写什么? 首先是介绍 AFM, 以及描述可用的设备类型及其使用方式。其次是查看已经研究过的生物样品类型, 以及了解这些研究的成功程度, 并评估 AFM 的使用是否在这些领域产生了新的知识或理解。一般来说, 我们希望了解什么是可以做的, 什么是不能做的。若可以做那么它是如何做的, 以及到目前为止做了什么和将来可能往哪里走。我们希望谁能从阅读这本书中获益? 我们希望本书能为查找 AFM 生物应用相关文献提供良好的资源基础。本书所提供的信息将使读者能够批判性地评估目前已经出版的和未来将出版的关于 AFM 生物应用的数据, 能够决定 AFM 是否能用于读者所感兴趣的领域。本书对于学习 AFM 新人而言将提供关于决定应用哪种技术、其内部局限性、如何去避免和识别假象, 以及如何优化 AFM 使用来解决问题等基础知识。

2 仪 器

2.1 原子力显微镜

AFM 没有任何的镜头,当考虑 AFM 如何工作时,第一件需要考虑的事情就是无视所有传统显微镜的设计概念。事实上,AFM 是通过“触摸”而非“观察”来对样品进行成像的。一个很好的比喻就是“盲人摸象”,盲人通过他们的手指触摸物体并通过他们所触摸的结果来构建大脑中的图像。如同盲人的手指,原子力显微镜能产生清晰的细节图,不仅包括被触摸物体的表面形貌,还包括其质地或材料特征,如软或硬、弹性或柔性、黏或滑。AFM 另外的应用将在后续章节进行更详细地讨论(第 3.3 节和第 7.1.2 节)。现在我们只考虑 AFM 在形貌学方面所提供的信息以及如何最优地实现。图 2.1 简略地介绍了原子力显微镜的主要特征。

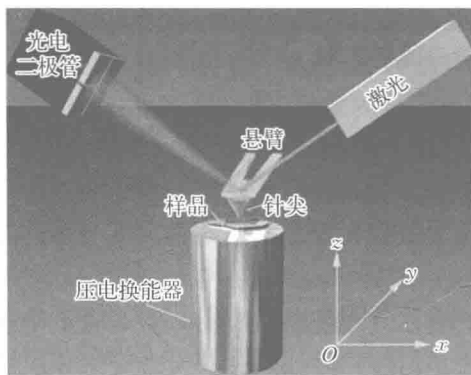


图 2.1 原子力显微镜示意图

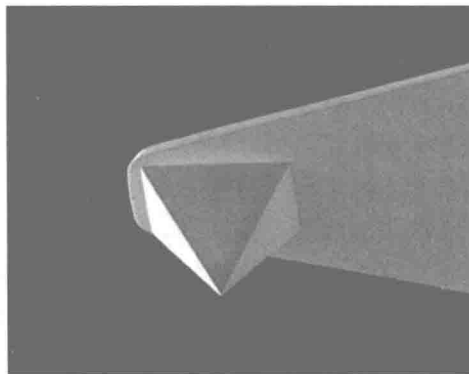


图 2.2 AFM 的探针针尖和悬臂的扫描电子显微镜 (SEM) 图 (锥体的基本长度是 $4\text{ }\mu\text{m}$, 图片由 Paul Gunning 拍摄)

原子力显微镜的第一个且毫无争议的最重要部分是触针或者说是探针针尖。它的作用是“触摸”,图 2.2 显示了一根原子力显微镜探针针尖的电子显微镜图。

探针是由悬臂及其末端微加工的一个十分尖锐的针尖所组成。这个微小的探针组合黏在玻璃基底(通常为 PMMA 胶膜)上以便于操作。这个尖(常命名为针