



博士后文库
中国博士后科学基金资助出版

动物肌肉与胶原纤维的超微 结构及生物力学特性

朱 杰 著



科学出版社

博士后文库

动物肌肉与胶原纤维的超微 结构及生物力学特性

朱 杰 著

中国博士后科学基金面上资助（20100481372）

中国博士后科学基金特别资助（2012T50823）

国家自然科学基金青年项目（11202170）

陕西省体育局科研课题（12001、13001）

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书以肌纤维和胶原纤维为主要研究对象,采用原子力显微镜高分辨成像和纳米压痕技术,研究了牛骨骼肌、心肌纤维、昆虫飞行肌纤维、鼠尾肌腱胶原蛋白纤维在不同生理状态的表面超微结构、压弹性和黏弹性,尝试建立肌纤维和胶原蛋白纤维的超微结构、力学特性和生理状态之间的内在联系。

本书可供高等院校畜牧学、兽医学、生理病理学、药理毒理学、生物物理学和生物力学专业的高年级本科生、研究生,以及从事相关领域研究的教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物肌肉与胶原纤维的超微结构及生物力学特性/朱杰著. —北京:科学出版社, 2016.4

(博士后文库)

ISBN 978-7-03-048030-9

I. ①动… II. ①朱… III. ①动物-肌肉组织-超微结构-研究 ②动物-肌肉组织-生物力学-研究 ③动物-胶原蛋白-超微结构-研究 ④动物-胶原蛋白-生物力学-研究 IV. ①Q954.66 ②Q512

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 072889 号

责任编辑:岳漫宇 夏 梁 / 责任校对:郑金红

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 4 月第 一 版 开本: 720×1000 B5

2016 年 4 月第一次印刷 印张: 7 1/2

字数: 132 000

定价: 68.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《博士后文库》编委会名单

主 任 陈宜瑜

副主任 詹文龙 李 扬

秘书长 邱春雷

编 委（按姓氏汉语拼音排序）

傅伯杰 付小兵 郭坤宇 胡 滨 贾国柱 刘 伟

卢秉恒 毛大立 权良柱 任南琪 万国华 王光谦

吴硕贤 杨宝峰 印遇龙 喻树迅 张文栋 赵 路

赵晓哲 钟登华 周宪梁

《博士后文库》序言

博士后制度已有一百多年的历史。世界上普遍认为，博士后研究经历不仅是博士们在取得博士学位后找到理想工作前的过渡阶段，而且也被看成是未来科学家职业生涯中必要的准备阶段。中国的博士后制度虽然起步晚，但已形成独具特色和相对独立、完善的人才培养和使用机制，成为造就高水平人才的重要途径，它已经并将继续为推进中国的科技教育事业和经济发展发挥越来越重要的作用。

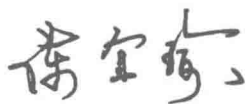
中国博士后制度实施之初，国家就设立了博士后科学基金，专门资助博士后研究人员开展创新探索。与其他基金主要资助“项目”不同，博士后科学基金的资助目标是“人”，也就是通过评价博士后研究人员的创新能力给予基金资助。博士后科学基金针对博士后研究人员处于科研创新“黄金时期”的成长特点，通过竞争申请、独立使用基金，使博士后研究人员树立科研自信心，塑造独立科研人格。经过30年的发展，截至2015年底，博士后科学基金资助总额约26.5亿元人民币，资助博士后研究人员5万3千余人，约占博士后招收人数的1/3。截至2014年底，在我国具有博士后经历的院士中，博士后科学基金资助获得者占72.5%。博士后科学基金已成为激发博士后研究人员成才的一颗“金种子”。

在博士后科学基金的资助下，博士后研究人员取得了众多前沿的科研成果。将这些科研成果出版成书，既是对博士后研究人员创新能力的肯定，也可以激发在站博士后研究人员开展创新研究的热情，同时也可以使博士后科研成果在更广范围内传播，更好地为社会所利用，进一步提高博士后科学基金的资助效益。

中国博士后科学基金会从2013年起实施博士后优秀学术专著出版资助工作。经专家评审，评选出博士后优秀学术著作，中国博士后

科学基金会资助出版费用。专著由科学出版社出版，统一命名为《博士后文库》。

资助出版工作是中国博士后科学基金会“十二五”期间进行基金资助改革的一项重要举措，虽然刚刚起步，但是我们对它寄予厚望。希望通过这项工作，使博士后研究人员的创新成果能够更好地服务于国家创新驱动发展战略，服务于创新型国家的建设，也希望更多的博士后研究人员借助这颗“金种子”迅速成长为国家需要的创新型、复合型、战略型人才。

Handwritten signature in black ink, consisting of three characters: 李俊强.

中国博士后科学基金会理事长

作者简介



朱杰，男，1980年生，湖南张家界人，博士，副教授，硕士研究生导师。国家肉牛改良中心、中美食品安全联合研究中心学术骨干成员。

1999.9~2010.6，先后为陕西师范大学物理学学士、声学硕士；西北农林科技大学-美国阿贡国家实验室联合培养生物物理学博士，获评“陕西省优秀毕业生”。2010.9~2014.12，西北农林科技大学兽医学、畜牧学博士后，任校博士后联谊会理事长。

现为中国病理生理学会、中国毒理学会、中国细胞生物学会、中国化学会终身会员；中国生物物理学会会员。担任陕西省科技计划评审专家；*Advances in Biomechanics & Applications* 等 7 种期刊编委；*Journal of Applied Physiology* 等 12 种 SCI、EI 期刊审稿人。

主要采用分子生化与细胞生物学方法、原子力显微镜与荧光显微成像技术，研究动物肌肉遗传发育与改良，肉品加工与贮藏过程中肌肉、胶原的生理功能、超微结构和生物力学特性的变化规律，为肉品安全高效生产和健康饮食做基础性探索。先后主持国家自然科学基金、中国博士后科学基金、陕西省自然科学基金等课题 15 项。在 *Journal of Biomechanics*、*International Journal of Nanomedicine*、*Scanning* 等国内外期刊上发表第一/通讯作者论文 48 篇，被 SCI、EI 收录 16 篇次，被 *PNAS*、*Biophysical Reviews*、*Cell Transplantation* 等国内外期刊累计他引 686 次。参编专著《生命科学中的单分子行为及细胞内实时检测》。

前 言

肌纤维和胶原纤维超微结构及生物力学特性的病理性变化往往会影响纤维对外界刺激信号的应答，而胶原纤维是肌内膜的主要成分，要深入研究肌纤维的功能，还必须研究肌外层的胶原纤维膜的超分子结构与力学特性，这些信息将有助于人们更好地了解胶原蛋白结构影响肌细胞-肌细胞、肌细胞-基质通讯的途径，以及胶原蛋白在肌组织生长、发育、病变和修复/再生过程中所起的作用，为动物育种改良、临床兽医治疗提供科学依据。

本研究以肌纤维和胶原纤维为主要研究对象，采用原子力显微镜高分辨成像和纳米压痕技术，研究了牛骨骼肌、心肌纤维、昆虫飞行肌纤维、鼠尾肌腱胶原蛋白纤维在不同生理状态的表面超微结构、压弹性和黏弹性，尝试找到肌纤维收缩过程中肌节长度、纤维直径等参数之间的关系；找到抗 I 型胶原蛋白抗体在胶原蛋白纤维上的结合位点，并得到二者之间的特异性作用力；从而建立肌纤维和胶原蛋白纤维的超微结构、力学特性和生理状态之间的内在联系。通过研究，获得了以下主要进展：

(1) 不同生理状态下，牛心肌纤维的肌节长度大致在 $1.22\sim 1.33\mu\text{m}$ ，其中松弛状态的肌节长度相对于僵直态有大约9%的增长，该结果提示，肌动蛋白和肌球蛋白会随着生理条件的变化而不断交替形成横桥，从而形成力学传导以应对外界环境的变化和信号刺激。与位置相关的压弹性曲线与 AFM 高度图的剖面曲线在外形上具有很高的相似性，相邻最大弹性系数点之间的距离与剖面分析得到的肌节长度非常接近，该结果显示了肌节的空间周期性和力学周期性的统一。源于 AFM 研究的肌纤维结构和弹性参数将会推动人们对生物结构、生物力学和生理功能之间关系的认识，为心脏疾病的基础研究和临床治疗提供更多的线索。

(2) 飞行肌肌原纤维在僵直态、松弛态和三种活化态的肌节长度分别为： $(2.10\pm 0.05)\mu\text{m}$ （僵直态）、 $(3.10\pm 0.10)\mu\text{m}$ （松弛态）、 $(2.50\pm 0.15)\mu\text{m}$ （活化态， 2mmol/L Ca^{2+} ）、 $(2.60\pm 0.25)\mu\text{m}$ （活化态， 5mmol/L Ca^{2+} ）和 $(2.55\pm 0.15)\mu\text{m}$ （活化态， 10mmol/L Ca^{2+} ），并得到 5mmol/L Ca^{2+} 浓度为合适的肌纤维活化浓度。另外，不论飞行肌纤维处于什么生理状态，A 带的长度始终保持在 $1.50\mu\text{m}$ 左右，而 I 带的长度则有较大的变化（ $0.7\sim 1.6\mu\text{m}$ ），该现象符合肌动蛋白纤维与肌球蛋白纤维在交替区域相对滑移的力学和空间结构模型。

AFM 高度图剖面分析的结果显示，不同生理状态下，肌原纤维内部肌动蛋白粗纤维之间的最小距离分别为 53nm （松弛态）、 58.5nm （僵直态）、 56.7nm （活化态， 2mmol/L Ca^{2+} ）、 54.8nm （活化态， 5mmol/L Ca^{2+} ）和 55.6nm （活化态， 10mmol/L

Ca^{2+}), 进而结合同根纤维的肌节长度变化建立了肌纤维的钙离子诱导等体积伸缩模型。根据沿肌球蛋白纤维纵向的剖面曲线分析图, 找到了横桥在肌球蛋白纤维表面的位置及其周期性间距为 $(37.5 \pm 0.5) \text{ nm}$ 。另外, 在同一生理状态下, 肌原纤维的弹性系数和杨氏模量的大小关系满足: $Z \text{ 线} > M \text{ 线} > \text{交替区域} > I \text{ 带}$; 同一肌节位置在不同活化态下的弹性系数和杨氏模量的大小关系基本满足: 活化态 $(5 \text{ mmol/L Ca}^{2+}) > \text{活化态} (2 \text{ mmol/L Ca}^{2+}) > \text{活化态} (10 \text{ mmol/L Ca}^{2+})$ 。

(3) 固定在云母片上的胶原纤维在空气中自然干燥时, 胶原纤维的 D 单元长度在干燥过程中并无显著变化, 基本稳定在 66.67 nm ; 而间隙带的深度则有一定的增加, 从 4.4 nm 逐渐增加到 4.7 nm , 增幅达 7%; 变化最为明显的则是纤维的直径, 从 201 nm 降到了 187 nm , 减幅达到 7%, 尽管如此, 由于 D 单元长度并无变化, 因而该方法 (样品制备和空气中成像) 依然适于研究胶原纤维的纵向精细结构。

文中采用抗 I 型胶原蛋白抗体偶联金纳米颗粒对胶原蛋白纤维成功实现了定位标记, AFM 研究发现, 抗体作用时间不同的纤维样品表面上的金纳米颗粒分布密度有较大差别。抗体作用时间越长, 金颗粒的密度越大; 其中, 抗体作用时间等于 2h 的金纳米颗粒密度与厂家提供的标准结合密度很接近, 但从实际的 AFM 图像质量可知, 抗体作用时间为 1h 的金颗粒密度更适合做抗体结合位置的统计分析。以抗体作用时间为 1h 的样品作为研究对象的实验结果显示, 与抗体结合的金颗粒主要分布在胶原纤维的交替区域, 显示出抗 I 型胶原蛋白抗体对胶原纤维交替区域的结合特异性。

(4) 用未加修饰的探针对抗体结合时间不同的胶原纤维样品进行了成像, 分别得到了高分辨的高度图和低分辨的摩擦图, 二者分别从结构细节和总体力学特性上反映出抗体在胶原纤维上的结合位点主要集中在交替区域。而未加修饰探针的单点力学测量结果显示, 胶原纤维表面结合的抗体对肌原纤维压弹性的测量几乎没有影响; 但对于黏附力的收集结果却有显著的影响, 特别是在交替区域, 随着抗体结合时间的增加, 探针与胶原纤维间的黏附力相对于探针与天然纤维样品之间的黏附力分别增加了 17.8%、48.9% 和 82.2%, 而间隙带的黏附力则保持相对稳定, 说明抗体主要分布在交替区域, 与前述高度图和摩擦图的结果保持一致。最后, 重点研究了抗体与胶原蛋白的结合力。主要用抗 I 型胶原蛋白抗体对探针进行了修饰, 并用修饰过的探针进行探针-天然胶原纤维间的黏附力 (结合力) 测量, 统计结果显示, 单个抗 I 型胶原蛋白抗体与胶原纤维交替区域的结合力约等于 250 pN 。

由于作者的能力和知识水平有限, 书中不足之处在所难免, 恳请广大读者和同行批评指正。

朱 杰

2015 年 9 月

陕西 杨凌

缩 略 词

英文缩写	英文全称	中文全称
AFM	atomic force microscope	原子力显微镜
SPM	scanning probe microscope	扫描探针显微镜
STM	scanning tunnel microscope	扫描隧道显微镜
LFM	lateral force microscope	侧向力/摩擦力显微镜
LSCM	laser scanning confocal microscope	激光扫描共聚焦显微镜
ATP	adenosine triphosphate	腺苷三磷酸
ATPase	adenosine triphosphatase	腺苷三磷酸合成酶

目 录

《博士后文库》序言

作者简介

前言

缩略词

第 1 章	绪论	1
1.1	原子力显微镜的成像原理与工作模式	1
1.2	原子力显微镜的力学测量原理	4
1.3	原子力显微镜在分子与细胞生物力学测量中的应用	6
1.4	心肌与胶原纤维超微结构与力学特性研究的意义	11
1.5	本研究的主要内容	14
第 2 章	探针污染物对纤维成像和力学测量的影响	15
2.1	肌纤维与胶原蛋白纤维的制备	15
2.2	蛋白纤维的 AFM 成像和力学测量	16
2.3	AFM 探针的清洗	16
2.4	污染物对纤维表面结构测量的影响	17
2.5	探针污染物对纤维力学测量的影响	21
2.6	小结	24
第 3 章	去膜心肌纤维的表面精细结构与压弹性研究	25
3.1	去膜心肌纤维的制备	26
3.2	心肌纤维表面结构的 AFM 研究	26
3.3	心肌纤维压弹性测量	27
3.4	肌节长度测量和粗糙度分析	27
3.5	心肌纤维的压弹性系数	30
3.6	肌纤维的杨氏模量	33
3.7	小结	34
第 4 章	钙离子浓度对肌节超微结构与弹性的影响	36
4.1	飞行肌纤维的制备	37
4.2	飞行肌纤维的超微结构测量	37
4.3	飞行肌纤维的压弹性测量	38
4.4	钙离子浓度对肌节周期性超微结构的影响	38

4.5	钙离子浓度对蛋白纤维间距常数和横桥周期的影响	41
4.6	钙离子浓度对肌节弹性系数和杨氏模量的影响	44
4.7	小结	48
第 5 章	免疫金标记法检测抗 I 型胶原蛋白抗体的结合位点	49
5.1	免疫金颗粒标记胶原纤维样品的制备	49
5.2	胶原纤维的超微结构测量	50
5.3	天然 I 型胶原纤维的表面超微结构	51
5.4	抗 I 型胶原蛋白抗体标记的胶原纤维的表面超微结构	54
5.5	小结	59
第 6 章	I 型胶原蛋白纤维的超微生物力学特性	60
6.1	天然和抗体标记 I 型胶原纤维的制备	60
6.2	AFM 探针的抗 I 型胶原蛋白抗体修饰	61
6.3	胶原纤维的成像定位与力学测量	62
6.4	天然和抗体标记 I 型胶原纤维的表面结构	63
6.5	天然和抗体标记 I 型胶原纤维的压弹性和黏附力	66
6.6	抗 I 型胶原蛋白抗体与胶原纤维的特异性结合	68
6.7	小结	70
第 7 章	肌肉和胶原纤维结构与力学特性研究的前景	72
7.1	主要创新点	74
7.2	存在的问题与不足之处	74
7.3	进一步研究的方向	76
参考文献	77
附录	86
附录 1	Lennard-Jones 势能公式	86
附录 2	范德瓦耳斯方程	87
附录 3	DLVO 理论	91
附录 4	接触力学简介	94
后记	103
编后记	105

第 1 章 绪 论

显微观测技术是人类视觉器官功能在微观尺度上的延伸与增强，它们的深入发展与广泛应用为人类科技进步和社会发展作出了并正在作着巨大的贡献。总体上，显微技术的发展大致经历了光学显微镜（optical microscopy, OM）、电子显微镜（electron microscopy, EM）和扫描探针显微镜（scanning probe microscopy, SPM）三个大的阶段。其中，Binnig 等在 1986 年发明的原子力显微镜（atomic force microscopy, AFM）是目前应用最为广泛的一种典型的扫描探针显微镜（Binnig *et al.*, 1986）。与现有的其他显微技术相比，AFM 以其原子级的高分辨成像能力、优秀的力学测量与操纵功能及简单易行的样品制备方法（可在溶液中成像）等特点（Hansma *et al.*, 1994）而备受关注，已在分子与细胞尺度上的表面超微结构（纳米结构）和生物力学等领域得到了广泛应用，在纳米尺度上逐步建立起了生物结构、力学特性与生理功能间的关系，并取得了辉煌的成就（Arkawa *et al.*, 1992; Rief *et al.*, 1997; Merkel *et al.*, 1999; Pelling *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Gaczynska and Osmulski, 2008; Kufer *et al.*, 2008; Dupres *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2010），由此开创了纳米生物学（nanobiology）时代。

本章主要介绍 AFM 的成像与力学测量的基本原理、AFM 在分子与细胞表面超微精细结构和超微生物力学测量等方面的应用，最后简略交代本书后续章节的研究主体内容。

1.1 原子力显微镜的成像原理与工作模式

AFM 的核心部件由四大部分组成：激光发生器（laser）、光电检测器（detector）、微悬臂（cantilever）和压电扫描管（scanner），如图 1-1a 所示。AFM 采用一端装有纳米级针尖（tip）的微悬臂来采集样品的表面结构信息，当针尖纵向接近样品时，与二者距离相关的相互作用力（图 1-2）就会引起微悬臂的形变（微悬臂的形变量可由光电检测器接收微悬臂上沿反射激光的位置及其改变来确定），用微悬臂的形变量（deflection of cantilever, D_C ）乘以其弹性系数 k 可得样品-针尖间的相互作用力 F_{ts} ，进而确定二者之间的距离和变化。在扫描样品时，若令初始扫描点的位置坐标为 (x_0, y_0, z_0) ，根据横向位移 $(\Delta x, \Delta y)$ 及针尖-样品相互作用变化 (Δz) ，便可确定新检测点的坐标 $(x = x_0 + \Delta x, y = y_0 + \Delta y, z = z_0 + \Delta z)$ ，由此可以确定扫描样

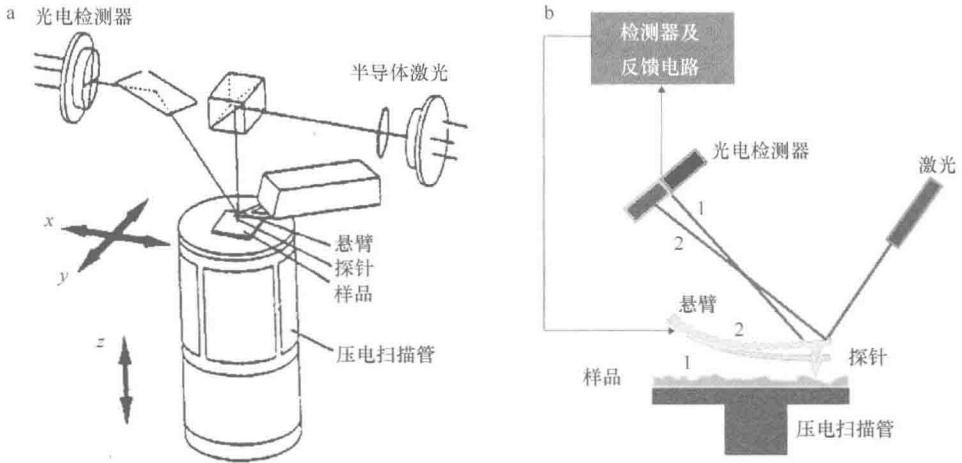


图 1-1 原子力显微镜成像的基本原理（样品扫描模式）(Zhu and Sun, 2005b)

(a) 原子力显微镜的基本组成单元：激光器、光电检测器、微悬臂、压电扫描管；(b) 当探针悬臂位置从 1 变到 2 时，发射激光的方向由 1 变到 2（入射激光方向不变），在光电检测器上的激光位点也会随之发生变化，通过反馈电路可以来控制扫描管的伸缩或探针的振幅

Fig. 1-1 Principle of atomic force microscopy (sample scanning mode)

(a) Illustration of basic units of atomic force microscopy: laser, detector, cantilever and scanner; (b) Reflection would change along with the deformation of cantilever from 1 to 2, and the location of laser in detector would change simultaneously, which would control the movement of scanner or amplitude of cantilever through feedback circuit (Zhu and Sun, 2005b)

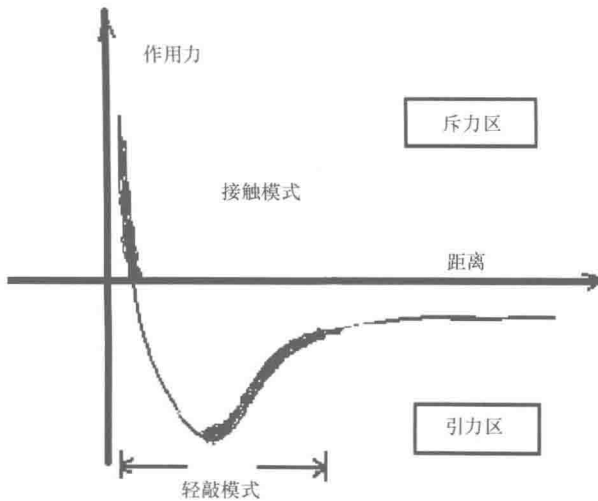


图 1-2 理想状态下探针-样品间相互作用力和二者间距之间的函数关系及原子力显微镜工作模式（接触模式和轻敲模式）对应的工作力区间 (Zhu and Sun, 2005b)

Fig. 1-2 Force-distance curves between tip and sample, and the working modes (contact mode and tapping mode) of atomic force microscopy in different force range (Zhu and Sun, 2005b)

品表面所有点的坐标 (x, y, z) ，进而描绘出样品的表面形貌 $f=f(x, y, z)$ ，其中 x, y 坐标描述的是样品表面的平面位置，而 z 坐标则给出了样品表面的相对高度及变化 (Binnig *et al.*, 1986; Zhu and Sun, 2005b)。

当选择不同的针尖-样品初始距离时，探针所处的力学状态是不同的，由此可将常用的 AFM 扫描模式分为接触模式 (contact mode) 和轻敲模式 (tapping mode) 两大类 (Hansma *et al.*, 1994; Shibata-Seki *et al.*, 1994)。接触模式下的针尖-样品距离处在小于零点几个纳米的斥力区域。当样品沿着水平方向扫描时，由于样品表面的高低起伏使得针尖-样品间距 (作用力) 发生变化，进而使悬臂形变量发生改变。当激光束照射到不同形变量的微悬臂背面并反射到位置灵敏的光电检测器时，检测器可检测到反射激光位点的变化，这一变化正好反映了悬臂形变量 (针尖-样品间距) 的改变，如图 1-1b 所示 (Zhu and Sun, 2005b)。反馈电路根据检测信号与预先设置值之间的差别，不断调整针尖-样品间距 (纵向移动样品) 以保持针尖-样品作用力不变，这样就可用压电扫描器的纵向伸缩量来表征样品的高度变化，这种测量模式称为恒力模式 (样品扫描)；若已知样品表面非常平滑时，可让针尖-样品距离保持恒定，针尖-样品作用力则直接反映了表面的高低，这时可用微悬臂形变的变化量来表征样品的高度变化，这种方法称恒高模式 (探针扫描)；恒力和恒高两种模式都属于接触模式测量方法。

轻敲模式与接触模式有较大不同，扫描时探针始终处于振动状态 [在微悬臂共振频率附近以更大的振幅 ($>20\text{nm}$) 驱动微悬臂]，使得针尖与样品间断地接触 (Umemura and Arakawa, 1993; Hansma *et al.*, 1994; Shibata-Seki *et al.*, 1994)。当针尖逐渐接近样品表面时，微悬臂振幅将会逐渐减小，而当针尖反向远离样品时，振幅又逐渐增大。反馈系统通过检测该振幅变化来不断调整针尖-样品间距进而控制微悬臂的振幅。由于针尖同样品接触，分辨率几乎与接触模式一样好；又因为探针高速振动，单次接触样品的时间非常短，探针作用力对样品的破坏作用比接触模式要小一些，适于分析柔软、黏性和脆性的生物学和医学样品 (Hansma *et al.*, 1994; Shibata-Seki *et al.*, 1994)。

表征样品表面高分辨的三维形貌是 AFM 作为显微技术最基本的功能，由于表面所有位点的高低起伏状态能够准确地以数值的形式表现出来，对表面整体图像进行剖面曲线分析 (section analysis)、粗糙度分析 (roughness analysis) 和颗粒度分析 (particle analysis) 等操作，可得到样品表面结构的长、宽、高等基本结构参数及考察点之间的水平距离和高度差值，也可研究这些参数在大的研究尺度上的统计分布规律；对小范围表面图像分析还可得到表面物质的分子聚集状态、表面积等参数；通过相关的可视化软件可对样品的形貌进行丰富的三维显示，如等亮度-高度对应法、高线显示法等，亦可转换不同的视角，让图像更适合观察者的直

观视觉, 在微观尺度上真正起到延伸与增强人类视觉器官功能的作用 (Zhu and Sun, 2005b)。

1.2 原子力显微镜的力学测量原理

根据 AFM 力学成像的基本原理可知, AFM 可用来进行力学测量, 因此有必要首先了解纳米级针尖与样品间的作用力。在扫描过程中, 由于针尖-样品间距非常小, 可用原子间的作用力进行推算。根据 Lennard-Jones 势能函数公式 (Lennard-Jones, 1931), 原子间的相互作用势能如下[式(1-1)]:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1-1)$$

式中, r 是研究原子间的距离, ε 等于势能阱的深度, σ 是互相作用的势能正好为零时的两体距离。由此可得 Lennard-Jones 势能对应的两个物体之间的作用力如式(1-2)所示 (附录 1):

$$F(r) = -\nabla V(r) = -\frac{d}{dr} V(r) \hat{r} = 4\varepsilon \left(12 \frac{\sigma^{12}}{r^{13}} - 6 \frac{\sigma^6}{r^7} \right) \hat{r} \quad (1-2)$$

第一项对应于两体在近距离时以互相排斥为主的作用 (原子间作用力), 第二项对应于两体在远距离时以互相吸引为主的作用 (范德瓦耳斯力) (Lennard-Jones, 1924, 1931; Smith and Howard, 1994; Drakova and Doyen, 2004)。

但是, 在实际的测量中, 由于样品表面可能发生形变, 从而产生形变力 (弹性力), 主要包括拉伸弹性 (tensile elasticity) 和压弹性 (compression elasticity) 两种; 样品表面也可能因存在液体而产生表面张力, 以及一些生物化学物质由于彼此间的化学结合而产生的化学力 (如黏附力和结合力等); 而当探针和样品接触到液体时, 常会观察到它们表面分布有静电荷, 因而产生静电力; 对于用特定的磁性材料制成的针尖和样品之间还存在磁力作用 (Hutter and Bechhorfer, 1993; Zhu *et al.*, 2007)。这些力的产生在很多情况下会影响 AFM 的成像质量, 若对探针和样品进行预处理并精心设计实验过程, 能有效地避免形变力、化学力、表面张力、静电力和磁力等的主要影响, 作为近似计算, 可以只考虑原子间的近距离斥力和长距离范德瓦耳斯力 (Johanssonp and Apell, 1997; Zhu *et al.*, 2007)。但在一些特殊过程中, 需要检测样品的弹性 (形变能力)、化学基团的分布及相互作用、表面电势 (静电荷分布)、磁畴分布 (Martin and Wichrama, 1987, 1988; Zhu *et al.*, 2007) 等物理化学参数, 则需要利用这些力进行表征。在生物医学研究领域, 主要用到前两类物理化学参数。

利用探针对生物样品进行纳米压痕操作过程 (nanoindentation) 中收集的力-

距曲线 (force-distance curve), 可定量计算生物材料的压弹性 (弹性系数、杨氏模量等) 及探针和样品间的黏附力 (adhesive force)。在纳米压痕过程中, 探针 (样品) 在压电扫描管的控制下接近并压入样品表面 (被探针压入), 随后又逐渐离开, 在每一个探针-样品距离上都对应了探针-样品间的作用力 (即探针微悬臂的形变量), 由此可给出纳米压痕过程的探针-样品间的力-距曲线, 典型的力-距曲线如图 1-3 所示。左侧空间为 AFM 测量时探针/样品所处的环境 (空气或液体), 右侧是所研究的样品区域, 这个力-距曲线由去程和回程两大部分组成。在去程曲线部分 (trace curve), 探针从远离样品处开始逐渐接近样品表面, 刚接触时会出现一个较小的力学突变点, 这是样品表面水膜对探针的吸引力造成的, 随后二者进一步靠近, 样品施加给探针的作用力会导致探针的形变, 反过来说, 探针施加给样品的力将会导致样品的形变; 在回程曲线部分 (retrace curve), 压电扫描管的 Z 向收缩会增大二者的间距 (作用力减小), 样品的形变也会随之减小, 当探针的形变为零时, 由于黏附力/结合力的存在样品并未和探针发生分离, 而是在探针的拽动下发生拉伸形变, 直到二者间的黏附力/结合力不能平衡压电扫描器的收缩力为止, 当探针和样品分离后, 探针会进一步远离样品直到停在设定的安全距离。从探针压入样品区域的力曲线可以得到样品形变量和弹性力之间的关系, 这样可计算样品的弹性系数和杨氏模量。根据回程曲线上相邻断开点之间的距离 (力), 可计算一次分离力, 这个力对应于探针和样品之间的黏附力或修饰在探针上的物质与样品之间的结合力。具体的分析可见第 2、第 3 和第 6 章相关内容。另外, 化学力测量的涉及面非常广泛, 如生物大分子与生物大分子、生物大分子与细胞 (器)、细

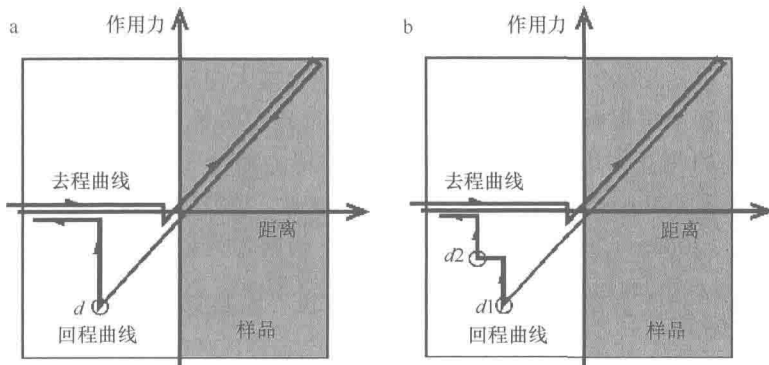


图 1-3 纳米压痕过程中探针-样品间典型的力-距曲线

(a) 探针和样品作用典型的力-距曲线, 其回程曲线只有一个断开点 d ; (b) 回程曲线上有两个断开点 d_1 和 d_2 的探针和样品作用的力-距曲线。左侧空间为样品外空间环境 (空气或液体)

Fig. 1-3 Force-distance curves between tip and sample in nanoindentation process

(a) Typical force-distance curve in the air with only one break point d on retrace zone; (b) Two break points appeared on the retrace curve of typical force-distance curve. Left side was gas or liquid