

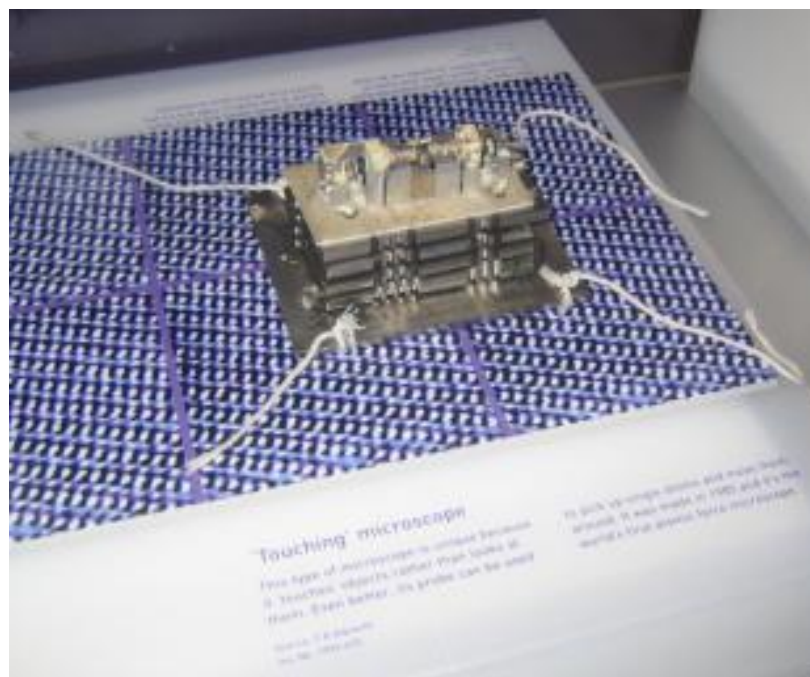
天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn

Park 生物型原子力显微镜对活细胞的观测

自上世纪四十年代末以来，生命科学在分子层面的发展突飞猛进，导致了许多传统生物学科的重构，细胞生物学便是深受其影响的一支。为了获知分子层面的运动与变化，细胞生物学迫切的需要获得比光学显微镜更精细的观测仪器。生物型原子力显微镜于是应运而生。

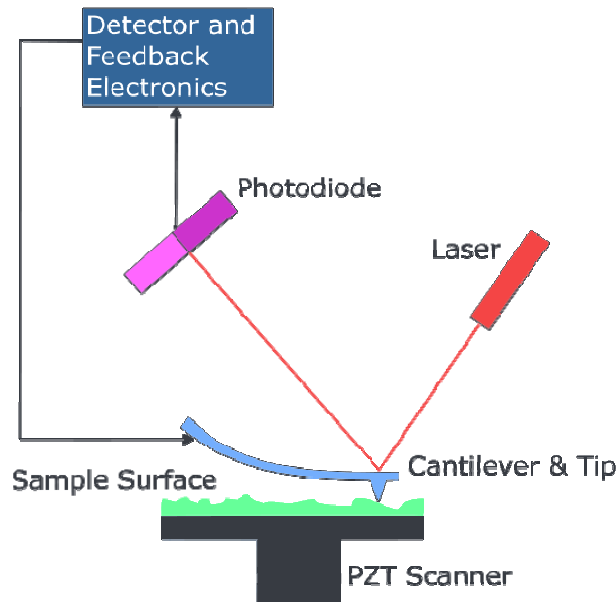
原子力显微镜是通过感知微小探针与样品表面的相互作用力的变化获取样品表面形貌的仪器。IBM 公司苏黎世研究中心的比宁 (Binning) 与斯坦福大学的魁特 (Calvin Quate) 于 1986 年发明第一台原子力显微镜。原子力显微镜的基本原理是当探针在样品表面扫描时，探针与样品表面原子间的相互作用力会使得微悬臂轻微变形，这样，微悬臂的轻微变形就可以作为探针和样品间作用力的直接量度。一束激光经微悬臂的背面反射到光电检测器，精确测量微悬臂的微小变形，由此反映样品表面形貌和其他表面结构。横向分辨率可达到 0.1 ~ 0.2 纳米，纵向分辨率高达 0.01 纳米。



第一台原子力显微镜

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn



原子力显微镜原理示意图

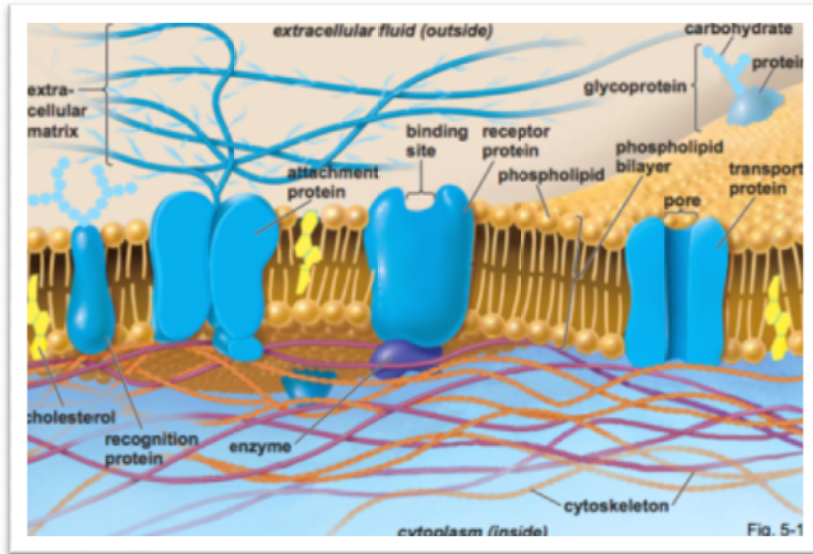
AFM 发明后不久就应用于细胞科学这一生物学最复杂的领域。AFM 不仅能够提供超光学极限的细胞结构图像，还能够探测细胞的微机械特性，利用 AFM 力-曲线技术甚至能够实时地检测细胞动力学和细胞运动过程。这些高分辨的结构特征和功能信息是其它任何一种显微技术都无法提供的。利用 AFM 直接成像方法，人们已经对固定的活细胞和亚细胞结构进行了深入研究。这些研究获得了关于细胞器的构造、细胞膜和细胞骨架更详细的信息。为了考察细胞膜结构的皱褶、层状脂肪物、微端丝和微绒毛等特征，人们将细胞固定在基底上再进行 AFM 观察。

AFM 在细胞研究方面的一个最重要用途是对活细胞的动力学过程、细胞间的相互作用以及细胞对其内外干扰因素的响应进行实时成像。现在 AFM 仪器在保证一定空间分辨率的前提下，对一些在时间要求方面不太高的细胞动力学过程如细胞生长、细胞内外物质的交换事件进行了研究，对细胞生长因子、荷尔蒙及其它生化试剂存在下对细胞形貌的影响也进行了现场考察。了解细胞的微机械性质有助于人们弄清楚细胞的骨架和功能；AFM 力-距离曲线能够对某些细胞表面的局部粘弹性特征进行监测。

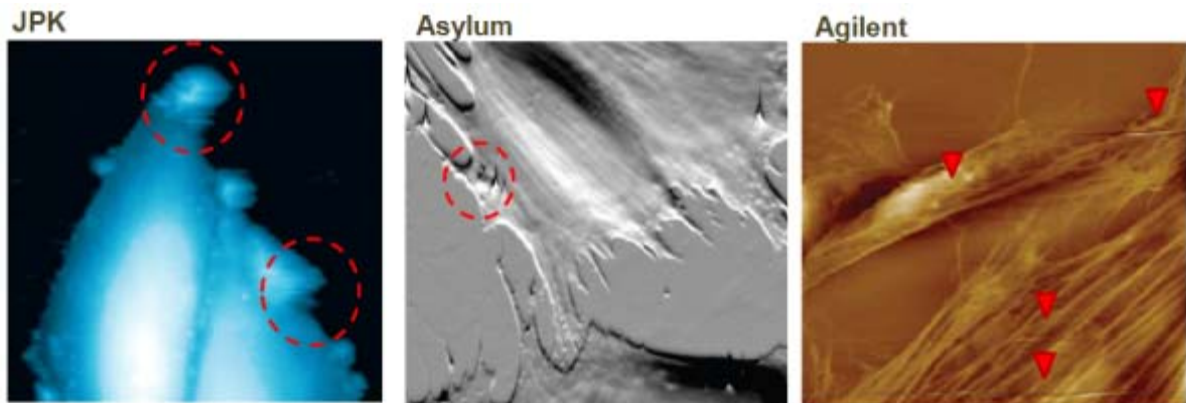
但是，对活细胞的观测依然是很困难的。因为细胞表面的磷脂双分子膜非常的柔软，使用接触模式或者轻敲模式都会划伤或刮除这层膜，一方面使得到的图像失真，另一方面，受损的细胞无法存活，不能实施动态的观察细胞的变化。

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn



细胞膜结构示意图



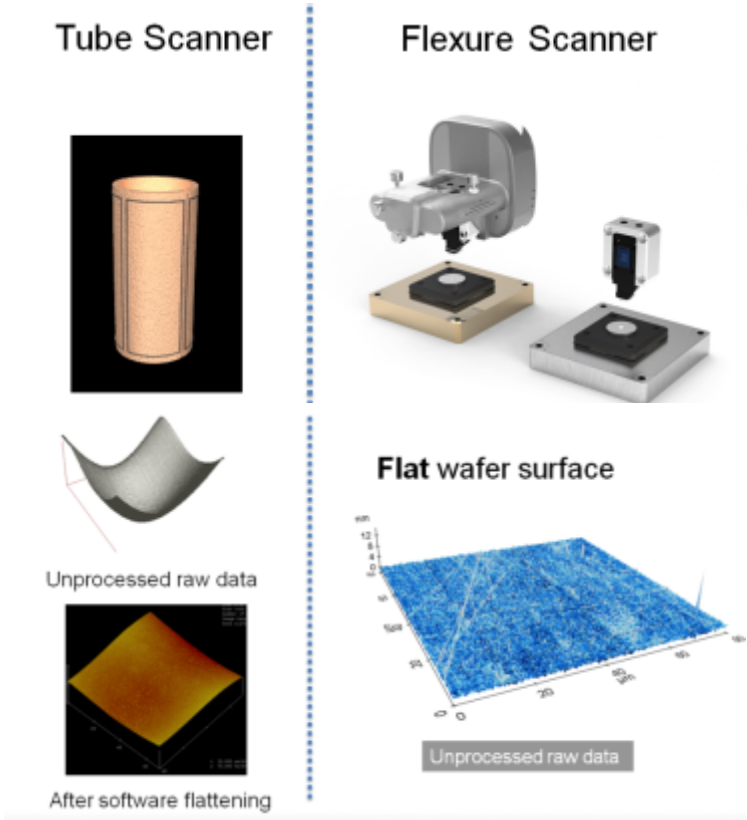
不同厂商 AFM 细胞扫描图片损伤示意图

针对目前生物型原子力显微镜的不足，Park Systems 公司退出了全新研发的针对活细胞实时动态观察的新平台——XE-Bio。

众所周知，Park 公司的原子力显微镜产品具有独特的三轴分离结构，克服了传统原子力显微镜使用的压电陶瓷管无法真实扫描平面的不足。同时由于将 Z 方向扫描器独立了出来，使其具有了高达 2-9KHz 的带宽，由此实现了真正意义上的非接触扫描。针尖在样品表面几个纳米的距离外振动，从始至终不与样品接触，避免了样品被针尖划伤以及针尖的磨损。不仅增强了图像的真实性，提高了图像获取的重复性和重现性，而且极大地降低了探针的损耗。

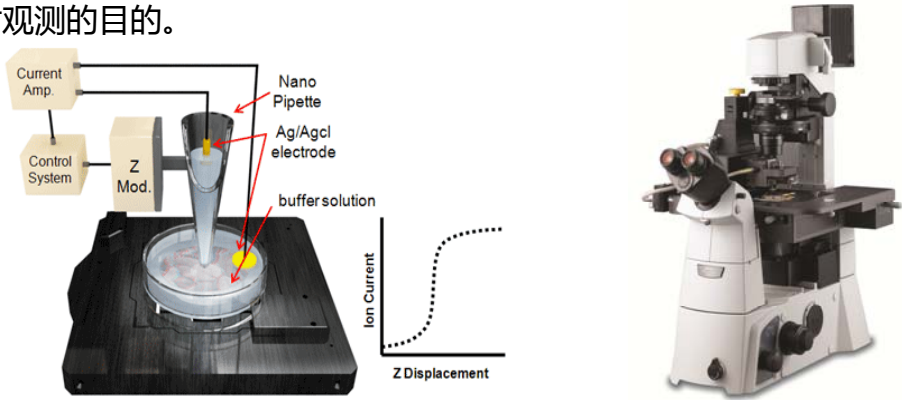
天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn



传统扫描器与三轴分离扫描器平面扫描对比

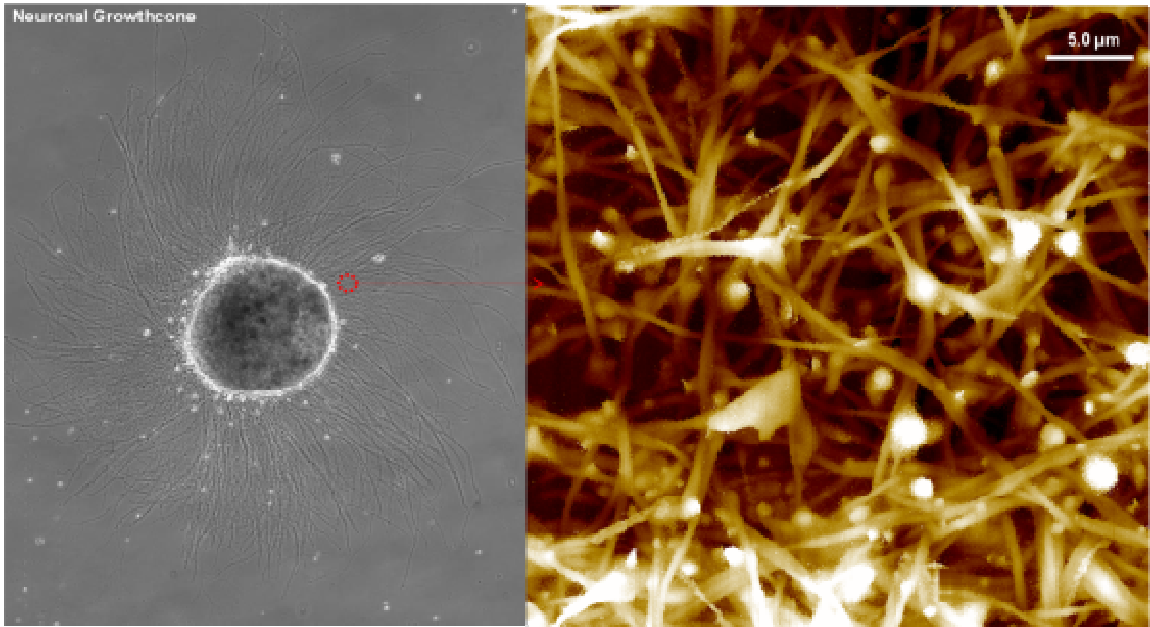
与以往所有生物性原子力显微镜不同的是，XE-Bio 在保持了三轴扫描器及真正非接触模式的优点以外，增加了一种新的扫描模式，离子电导扫描模式（Scanning Ion Conductance Microscope）。这种模式是膜片钳技术的一种延伸，通过控制微孔纤维中的离子电流保持探针与样品间的扫描距离，同时清晰成像。这种技术不会对细胞产生任何的损伤，因此可以对活细胞直接进行观测，无需固定。样品台可以直接安置标准培养皿，辅以环境控制舱，维持细胞培养的温度湿度和二氧化碳浓度，就可以达到长期培养实时观测的目的。



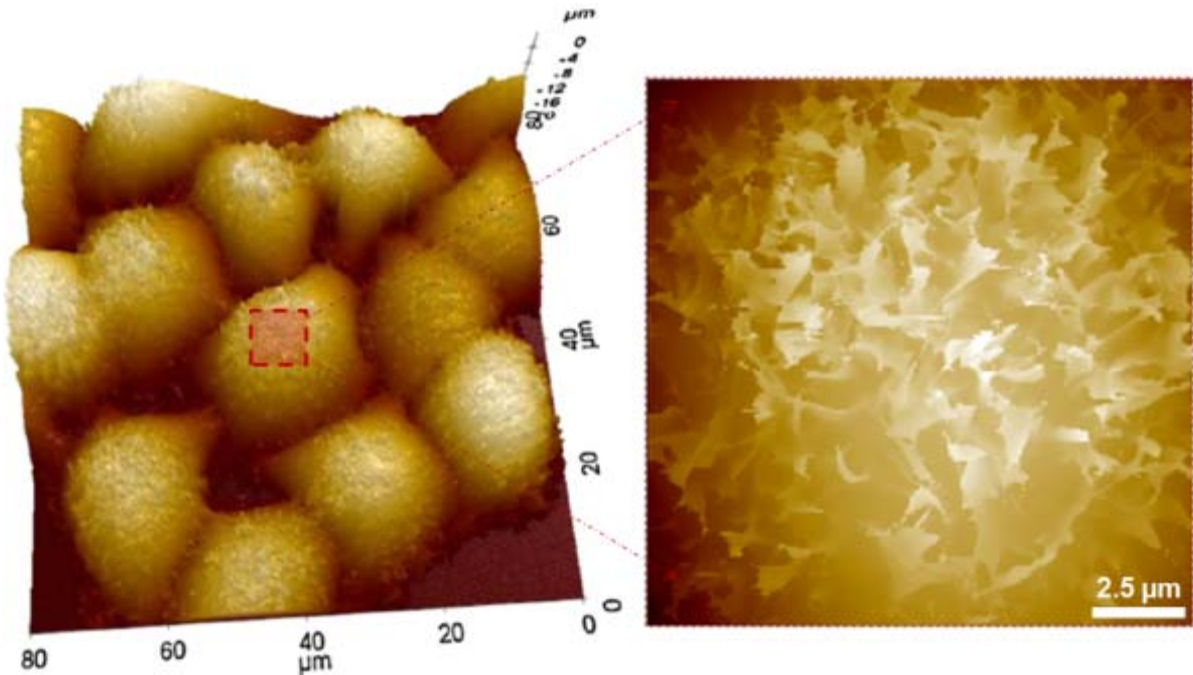
天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn

离子电导扫描模式原理图及 XE-Bio 实物图



左侧这张图是生长状态下的神经元细胞，右侧是选取其 30 μm 局部神经元进行离子电导扫描的图片，其树突和突触都清晰可见。值得注意的是，这是在液体培养环境中进行的扫描，这些神经元突触都是悬浮于 PBS 培养液中，传统原子力显微镜的任何模式也无法获取这样的图片。

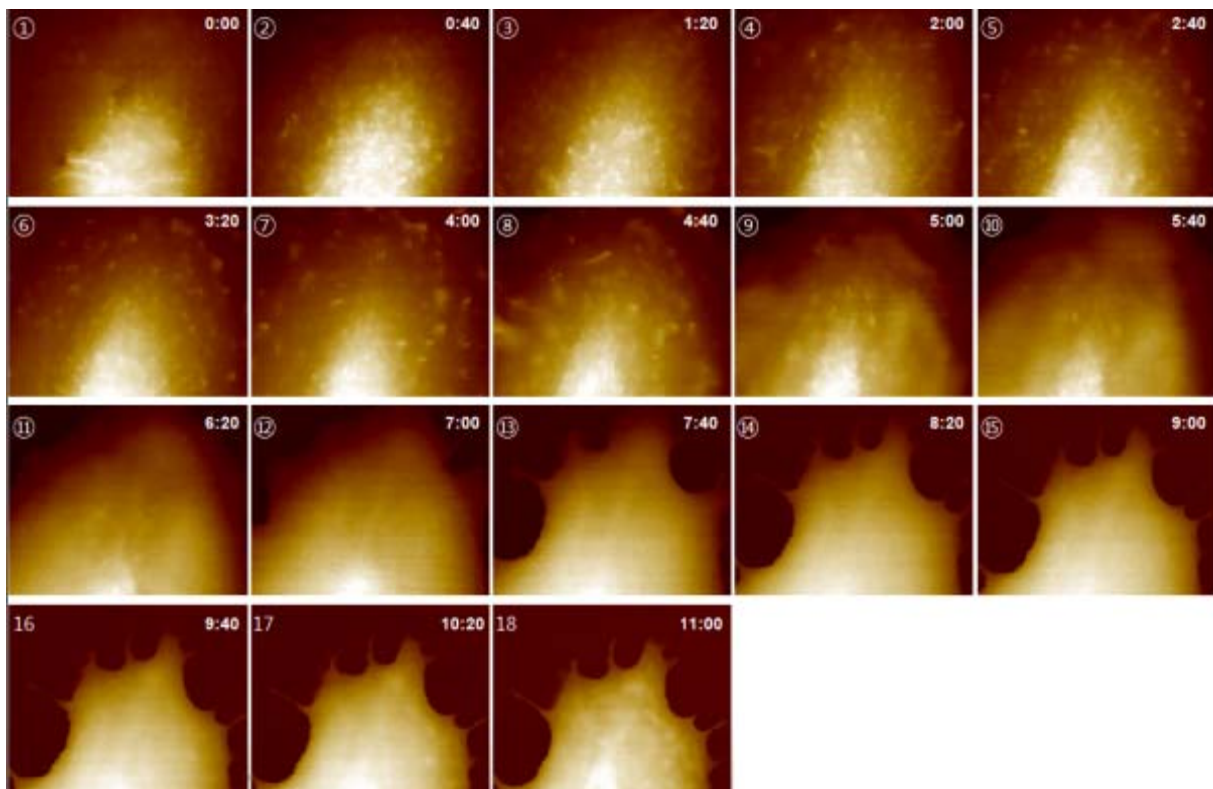


这是对 HeLa 细胞不同尺度的两幅图片，同样也是在 PBS 培养液中扫描的结果。

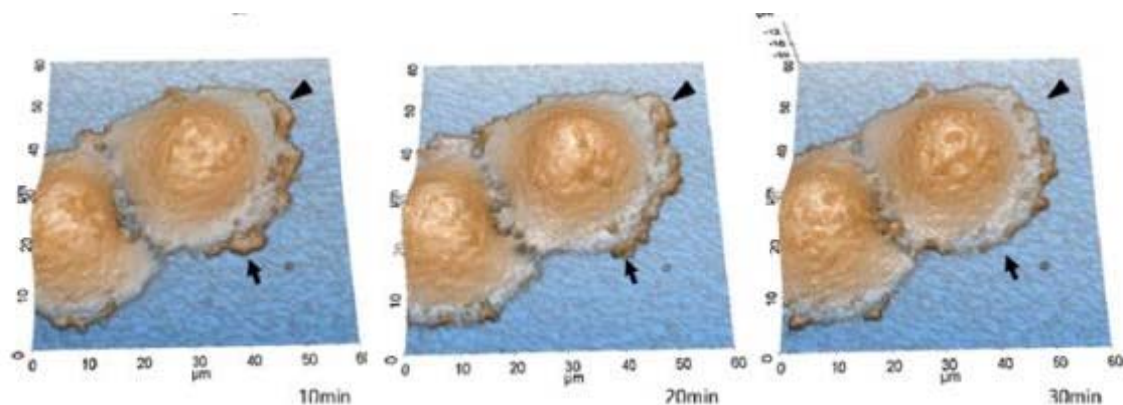
天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn

左侧尺度较大，为 $80\ \mu\text{m}$ ，可见数个完整细胞；右侧有选取一个细胞的局部进行扫描的结果，尺寸为 $15\ \mu\text{m}$ ，这张图显示的是其表面的膜结构，混合了磷脂膜和各种膜蛋白。这张图同样也无法由传统原子力显微镜得到，因为这些膜和蛋白无法承受探针的刮擦和敲击。



C2C12 细胞株长时间培养原位观察图片。扫描范围 $15\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ ，DMEM 培养液环境，培养 11 小时，每间隔 40 分钟取一幅图。细胞的生长过程完美的展现在眼前。

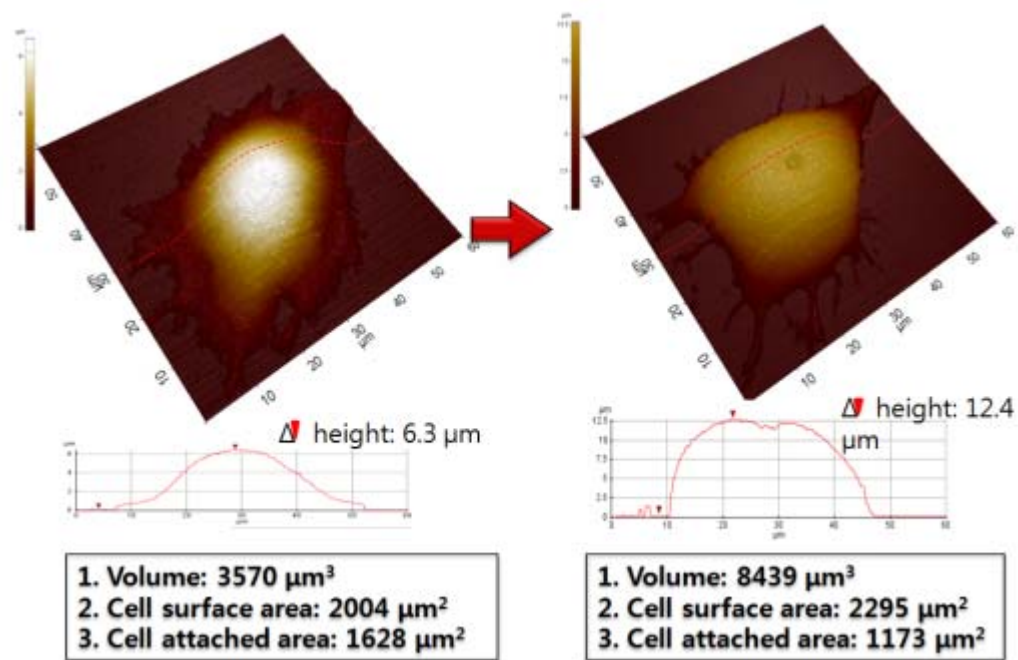


另一幅实时原位观察细胞生长的系列图片，Hela 细胞，PBS 培养，每十分钟取一幅图，可以观察到边缘的变化。

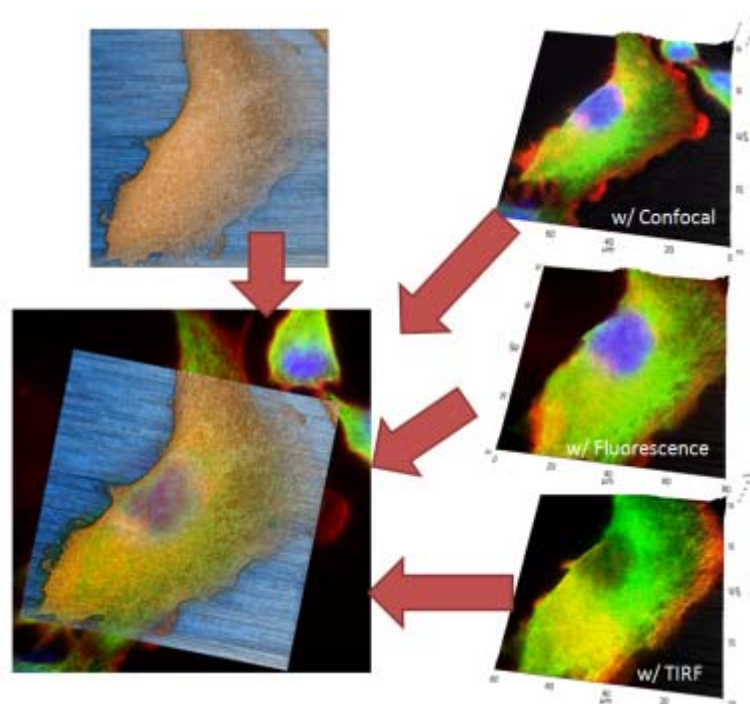
天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn

除了形态观测外，XE-Bio 还可以进行细胞容积的测量以及其他机械性能的测定。这使得传统的细胞实验观察全面的有二维提升到三维。由于 XE-Bio 使用的是一个荧光共聚焦显微镜底座，因此还可以将不同成像方式得到的图片进行叠加，在一幅图上显示不同荧光染料图像及形貌信息。



C2C12 细胞培养过程中容积变化图。该图显示了经过一段时间培养后细胞面积、容积的变化。



天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL: 010-64010651
FAX: 010-64060202
E-MAIL: techcomp@techcomp.cn

用不同的激发波长分别获得不同染料荧光下的图片，同时获取该细胞的离子电导扫描形貌图，将四幅图综合在一起，既可以对细胞表面不同区域的形貌、成分、变化等多种信息进行分析，更有效的利用每一次实验结果。