

# 原子力显微镜在微生物学领域的应用\*

石万良 谢志雄\*\* 沈 萍

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

**摘要:** 原子力显微镜是揭示微生物表面结构及其与功能相关性的一种新的有力的工具,它具有比传统电子显微镜更高的放大倍数和极高的分辨率,能对从原子到分子尺度的结构进行三维成像和测量,并且可以在生理条件下实时进行。因此,原子力显微镜越来越多地应用到微生物学的各个方面,并且取得了许多令人鼓舞的结果。

**关键词:** 原子力显微镜, 微生物学, 生物大分子

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0109-05

---

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20207005)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20207005)

\*\* 联系人 E-mail: hsiech@263.net

收稿日期: 2003-02-10, 修回日期: 2003-06-05

## THE APPLICATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN MICROBIOLOGY

SHI Wan-liang XIE Zhi-Xiong SHEN Ping

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** Atomic force microscopy is a powerful new tool to investigate the structure and measure the relationship between structure of surfaces and functions in microorganisms. Comparing with conventional electron microscope, atomic force microscope has higher resolution and can image real-time structures from atomic to molecular scale in three-dimensional mode under physiological condition. Therefore, atomic force microscope is being used in almost every aspect of microbiology and has gotten many exciting findings.

**Key word:** Atomic force microscopy, Microbiology, Biomacromolecules

绝大多数微生物的大小都远远低于肉眼的观察极限,一般必须借助显微镜放大系统的作用才能看到它们的个体形态和内部构造,因此,显微镜在微生物学研究过程中起非常重要的作用<sup>[1]</sup>。原子力显微镜(atomic force microscope, 以下简称为 AFM)是 80 年代初问世的扫描探针显微镜(scanning probe microscope, SPM)的一种。AFM 是利用细小的探针对样品表面进行扫描来对样品进行“观察”,它通过一个激光装置来监测探针随样品表面的升降变化,从而获取样品表面形貌的信息。探针的针尖只有原子那样大小,因而其分辨率能达到原子级,能对从原子到分子尺度的结构进行三维成像和测量;另一方面,由于探针针尖与样品接触时相互的作用力已超出万有引力的范畴,是通过对原子相互作用力的测量来成像,因而取名为原子力显微镜。AFM 可以用于对不具导电性和生理状态的各种生物样品,并且可在大气条件或溶液中都能进行,因而观察时只需很少或不需对样品作前期处理,这样就使 AFM 能观察任何活的生命样品及动态过程。它的放大倍数高达 10 亿倍,远远超过以往的任何显微镜放大倍数,且分辨率极高,可以直接观察物质的分子和原子。AFM 一出现就成为微生物学研究的有力的工具。

### 1 AFM 的工作原理

它通常使用氮化硅作为一个灵敏的弹性微悬臂,其尖端有一个很尖的探针用来在样品表面扫描,AFM 探针安装在一个灵活的悬臂上,激光二极管发出的一束激光经悬臂反射到一个分裂式光电二极管上,当探针在样品表面扫描时,由于样品表面原子结构起伏不平,悬臂也就随之起伏,于是激光束的反射也就起伏。光电二极管将其接收、放大,即可获得样品表面凹凸信息的原子结构图像(图 1)。

AFM 检测的是微悬臂的偏移量,而此偏移量取决于样品与探针之间的相互作用力,其相互作用力主要是针尖最后一个原子和样品表面附近最后一个原子之间的作用力,这种作用力可以测量出来,并且表示出样品的物理特性,例如:分子间的相互作用、表面的疏水性、表面的变化和机制方面的特性,因此可以揭示微生物结构和功能的关系<sup>[2]</sup>。利用 AFM 可以获得具有极高分辨率的微生物原位实时的三维结构图像,这就为人类对微观世界的进一步探索提供了理想的工具。

### 2 AFM 的工作模式

AFM 有两种不同的工作模式:接触模式(contact mode)和动态模式(dynamic

mode)<sup>[3]</sup>。

接触模式(图1,右上)是探针与样品表面紧密接触并在表面上滑动。针尖与样品之间的相互作用力是两者相接触原子间的排斥力,约为 $10^{-8} \text{ N} \sim 10^{-11} \text{ N}$ ,接触模式通常就是靠这种排斥力来获得稳定、高分辨率样品表面形貌图像。但由于针尖在样品表面上滑动及样品表面与针尖的粘附力,可能使得针尖受到损害,样品产生变形,故对易变形的低弹性样品存在缺点。

动态模式(图1)是探针针尖始终不与样品表面接触,在样品表面上方 $5 \text{ nm} \sim 20 \text{ nm}$ 距离内扫描,针尖与样品之间的距离是通过保持微悬臂共振频率或振幅恒定来控制的,这样样品的高度值准确,适用于物质的表面分析。动态模式主要有轻敲模式,它通过调制压电陶瓷驱动器使带针尖的微悬臂以某一高频的共振频率和 $0.01 \text{ nm} \sim 1 \text{ nm}$ 的振幅在Z方向上共振,而微悬臂的共振频率可通过氟化橡胶减振器来改变。同时反馈系统通过调整样品与针尖间距来控制微悬臂振幅与相位,记录样品的上下移动情况即在Z方向上扫描器的移动情况来获得图像。采用轻敲模式时针尖与样品之间频繁接触的时间相当短,针尖与样品可以接触,也可以不接触,它有足够的振幅来克服样品与针尖之间的粘附力。因此适用于柔软、易脆和粘附性较强的样品,并且不对它们产生破坏,这种模式在聚合物聚合物的结构研究和生物大分子的结构研究中应用广泛。

通常在微生物的形态观察过程中采用接触模式较为广泛,轻敲模式则用于液体环境中微生物的观察以及生物大分子的研究方面。观察到的图像都可达到原子级的高分辨率,可观察活的细胞及其某些特性。因此,AFM在微生物学研究过程中极具优越性。

### 3 AFM在微生物学中的应用

**3.1 AFM用于微生物形态观察** 观察活细胞可以用光学显微镜,但是放大率和分辨率都受到限制;放大率和分辨率高的电子显微镜要求严格的制样和观察条件,并且不能用来观察活细胞。AFM可以用于微生物细胞的多种条件下的观察。

自AFM发明以来,许多人用来观察过各种类型的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和病毒形态,取得了用其它显微镜观察不到的结果。Bolshakova等<sup>[4]</sup>观察到大肠杆菌在液体培养条件下的活体三维图像(图2)。此外还可以观察到乳酸球菌(*Lactococcus lactis*)的分裂图<sup>[5]</sup>和奇异变形杆菌(*Proteus Mirabilis*)的迁徙生长

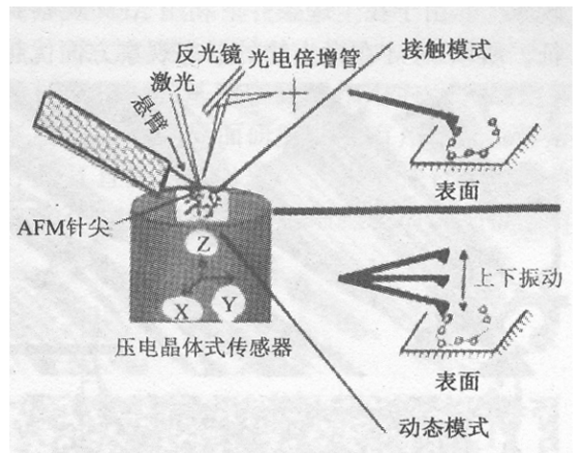


图1 AFM工作原理和工作模式

X, Y, Z分别代表纵向,侧向和垂直方向

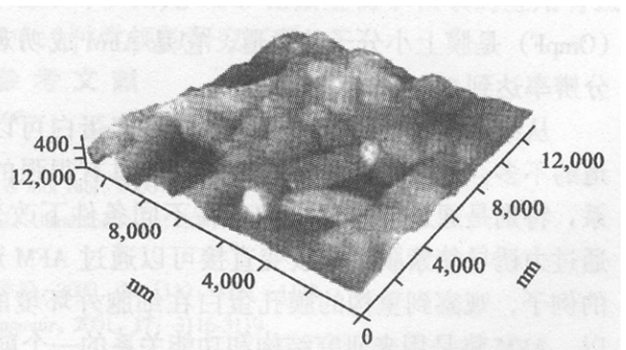


图2 AFM观察到大肠杆菌在液体培养条件下的三维图像

现象<sup>[6]</sup>。由于在生理条件下利用 AFM 观察到的图像更加逼真地反映出微生物的形态特征，所以 AFM 在微生物的形态观察方面优越于其它显微镜。

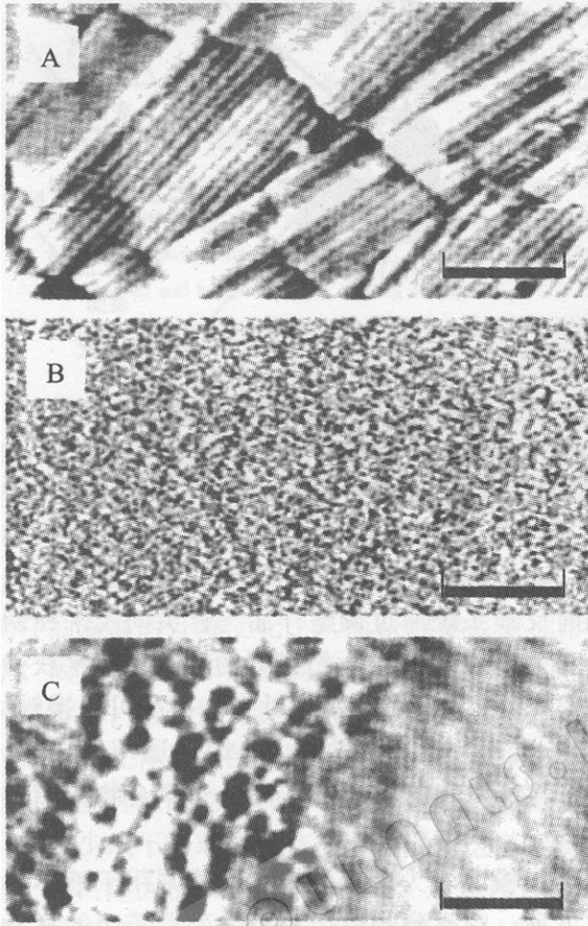


图3 细胞表面亚显微结构

A 米曲霉休眠孢子表面, B 酿酒酵母细胞表面,  
C 乳酸乳杆菌细胞表面

**3.2 观察细胞表层亚分子结构** 利用 AFM 不仅可以高分辨率地观察活体微生物的形态特征，还可以观察细胞表层亚分子结构。如 AFM 观察到在液体环境中的米曲霉孢子<sup>[7]</sup>、酿酒酵母和乳酸乳杆菌表面结构<sup>[8]</sup> (图3)。可以看到米曲霉孢子在休眠状态下其表面的棒状结构成规则排列，酿酒酵母的细胞表面则非常光滑，而乳酸乳杆菌表面是海绵样的网状结构，还有一些小孔分布。

过去 10 多年间，广泛使用 AFM 观察到细胞表层蛋白质的二维结构，以前则是通过 X 射线晶体学和电子晶体学方法结合起来研究蛋白质结构才接近原子级的分辨率<sup>[9]</sup>，而 AFM 将两种方法合为一体，利用分子重构可以直接在细胞生理条件下观察蛋白样品的二维结构。

从嗜盐古生菌中分离到的紫膜是用 AFM 观察到的蛋白质二维结构最成功的范例，可以达到原子级的分辨率。最近采用轻敲模式可以看到紫膜的迂回单个多肽环的高分辨率图像，并且没有任何变形<sup>[10]</sup>。

革兰氏阴性菌外膜的膜孔蛋白 (OmpF) 是膜上小分子的通道，它是 AFM 成功观察到精的侧向分辨率达到 1nm，垂直分辨率达到 0.1nm 水平<sup>[2]</sup>。

从结构学观点来看，细胞表层许多蛋白可以确定其属性，但是其特殊的功能却知道的不多，从最新的资料看来，AFM 具有很强的功能来研究表层蛋白结构和功能的关系，特别是通过单个蛋白构象在不同条件下改变来阐明结构与功能间的关系。例如：通过力诱导使紫膜构象改变直接可以通过 AFM 观察到 OmpF 蛋白细微结构的是一个好的例子，观察到重构的膜孔蛋白在细胞外环境的电压或 PH 值改变时构象改变<sup>[12]</sup>。所以，AFM 将是用来研究结构和功能关系的一个前景广阔的工具。

**3.3 生物大分子物理特性的分析** 近年来利用 AFM 研究分子间相互作用 (如：疏水性和电子相互作用等)，描绘表面的物理图谱，检测细胞壁的刚性及表面大分子的伸缩性等已有不少报道。

细胞的许多属性如：微生物的粘性和微生物的凝聚以及分子识别在医药和生物产品加工行业有重要意义，掌握这些信息需要了解细胞表面分子作用的知识，近年来已

有许多方法和技术利用 AFM 来研究表面分子间相互作用和理化性质,如:细胞探针技术,就是将细胞直接固定在 AFM 探针针尖上,通过检测细胞与样品间力与距离曲线来说明两者间的关系。用这种方法测量出大肠杆菌和不同基质表面的作用力<sup>[11]</sup>。细胞探针技术对生物地球化学和地理微生物学中矿物和微生物界面研究非常有用。在液体环境中大肠杆菌和各种矿物质间粘附力可以用 AFM 直接测量出来<sup>[13]</sup>。AFM 探针也能用来测量配体和受体间的作用力<sup>[14]</sup>。这些研究在微生物学中用来确定细胞表面识别位点有巨大的潜力并且为生物医学打开新的大门。

AFM 以其对力的高度敏感性为特征,它可以测量单个分子间作用力,因此可以利用 AFM 来研究细胞表面大分子的弹性。当 AFM 探针接触到被测定的大分子时,在探针收回时就表现为吸引延伸力,即:粘附峰值为大分子最大弹力。例如:在米曲霉出芽孢子表面的研究表明其表面的一种多糖大分子的弹性被测出来,弹力的峰值范围在  $400 \pm 100\text{pN}$  (图 4)。有人认为这些大分子的弹性可能与细胞的粘附和凝聚有关<sup>[7]</sup>。

以上的研究结果表明 AFM 的测量手段对未来微生物学在理解细胞表面结构和阐明结构与功能之间关系方面产生重要影响。

#### 4 结束语

自 AFM 问世以来的十几年间在微生物学领域取得了许多成果,利用 AFM 获得微生物细胞高分辨率的形态图像、表面结构图像以及大分子的许多特性,尤其是能够在原位实时观察微生物学中的许多现象。但是生物样品有其自身的特点而使 AFM 的有些优势没有完全发挥出来,如何制造出更适合观察生物样品的针尖和改进生物样品观察方法是发挥 AFM 优势的关键;短短的十几年来,AFM 也有很快的发展,如研制出高速 AFM,并将免疫学方面的有关技术结合起来等。因此 AFM 在微生物学领域的应用有强大的生命力,它必将成为微生物学领域中一种常规的研究工具。

#### 参考文献

- [1] 沈 萍. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [2] Dufrene Y F. J B, 2002, **184** (19): 5205 ~ 5213.
- [3] Jordanka Z, Stuart M L, Sanford H L. Prog Biophys & Mol Biol, 2000, **74**: 37 ~ 61.
- [4] Bolshakova A V, Kiselyovaa O I, Filonova A S, et al. Ultramicroscopy, 2001, **86**: 121 ~ 128.
- [5] Dufrene Y F. Micron, 2001, **32**: 153 ~ 165.
- [6] 邓国宏, 徐启旺, 王 琛, 等. 第三军医大学学报, 2000, **22** (11): 1111 ~ 1112.
- [7] van der Aa B C, Michel R M, Asther M, et al. Langmuir, 2001, **17**: 3116-3119.
- [8] Boonaert C J, Toniazzo P V, Mustin C, et al. Colloids Surf B Biointerfaces, 2002, **23**: 201 ~ 211.
- [9] Müller D J, Heymann J B, Oesterhelt F, et al. Biochim Biophys Acta, 2000, **1460**: 27 ~ 38.
- [10] Boulbitch, Quinn A B, Pink D. Phys Rev Lett, 2000, **85**: 5246 ~ 5249.
- [11] Müller D J, Engel A. J Mol Biol, 1999, **285**: 1347 ~ 1351.
- [12] Ong Y L, Razatos A, Georgiou G, et al. Langmuir, 1999, **15**: 2719 ~ 2725.
- [13] Lower S K, Tadanier C J, Hochella M F. Geochim Cosmochim Acta, 2000, **60**: 2473 ~ 2480.
- [14] Arnoldi M, Kacher C M, B? uerlein E, et al. Appl Phys A, 1998, **66**: 613 ~ S617.

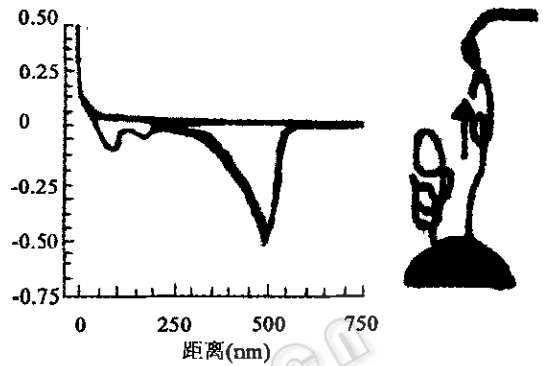


图 4 萌发的米曲霉孢子胞外多糖拉伸示意图及典型的力与距离曲线