

原子力显微镜在生物领域中的应用

张晓清^{1*} 卜庆珍² 裴晓琴³ 闫仲丽¹ 降升平¹ 孙平²

(1. 天津科技大学现代分析技术研究中心 天津 300457)

(2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津 300457)

(3. 淮海工学院化工系 连云港 222005)

摘要: 原子力显微镜(AFM)作为生物样品表面表征的有力工具, 具有独特的优势。本文在介绍原子力显微镜基本原理的基础上, 综述了原子力显微镜样品制备以及原子力显微镜形貌分析、力曲线以及动力学分析在生物领域中的应用。

关键词: 原子力显微镜(AFM), 原理, 样品制备, 应用

The Application of Atomic Force Microscope in Biological Field

ZHANG Xiao-Qing^{1*} BU Qing-Zhen² PEI Xiao-Qin³ YAN Zhong-Li¹ JIANG Sheng-Ping¹
SUN Ping²

(1. *Research Center for Modern Analysis Techniques, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457*)

(2. *College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457*)

(3. *Department of Chemistry and Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005*)

Abstract: Atomic force microscope (AFM) has become a powerful tool for the characterization of bio-samples surfaces. In this paper, the working principles and methods of AFM were explained and the applications of the sample preparation, image analysis, force curve and the dynamic analysis in the biological field were reviewed.

Keywords: Atomic force microscopy (AFM), Principle, Sample preparation, Application

Binnig 等 1986 年发明了第一台原子力显微镜 (Atomic force microscopy, AFM), 从此, 人们可以在纳米, 甚至埃米级范围内对样品表面形貌进行表征^[1]。与光学显微镜(OM)和其他电子显微镜(EM)相比, AFM 具有原子级分辨率, 可在真空、大气、液体及温控条件下探测, 样品可以是导体、非导体, 也可以是柔性的、甚至是活体生物样品, AFM 具有样品制备简单, 扫描过程中对样品无损伤, 能得到三维

图像等优点, 并可对样品进行定性和定量分析。

AFM 能够表征样品的表面形貌, 研究样品的表面性质, 在近生理条件下探测分子间作用的动力学过程等, 因此 AFM 受到人们的广泛关注。生物学家正是利用 AFM 这些功能, 对生物结构、分子间作用、动力学等进行研究。本文主要从 AFM 原理、样品制备及其在生物领域中的应用等几个方面进行了系统地阐述。

* 通讯作者: Tel: 022-60601361; ✉ wzwzqx2001@126.com
收稿日期: 2007-09-09; 接受日期: 2007-11-13

1 AFM 原理及方法

图 1 是 AFM 的原理示意图。探针的悬臂作为激光的反射界面, 探针在样品表面扫描时, 探针和样品之间的相互作用, 引起悬臂的偏转或者探针的振动, 进而造成激光反射的改变。反馈系统通过控制扫描管 Z 方向垂直移动, 对样品的每一点(X, Y)进行扫描, 反射的激光进入光电检测器, 转化成电脉冲信号, 经过计算机处理转换成或明或暗的区域, 这样通过记录扫描管在每一点(X, Y)上的垂直位置, 可以获得样品表面形貌成像的原始数据, 从而产生了有明显对比度的样品表面形貌图像, 并可得到三维图像。

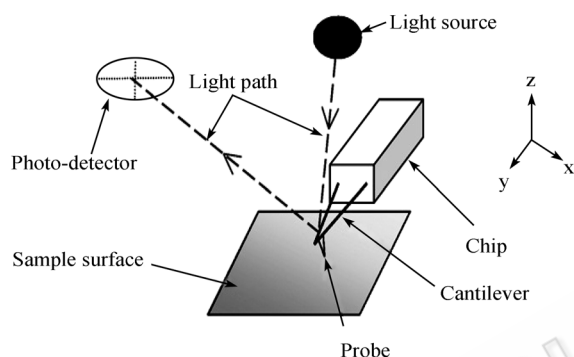


图 1 原子力显微镜的原理图

Fig. 1 The principle of AFM

AFM 具有很多工作模式, 这里仅介绍根据作用力不同而划分的 3 种模式: 接触模式(Contact mode)、轻敲模式(Tapping mode)和非接触模式(Non contact mode)。它们分别发生在不同力区域内(图 2)。

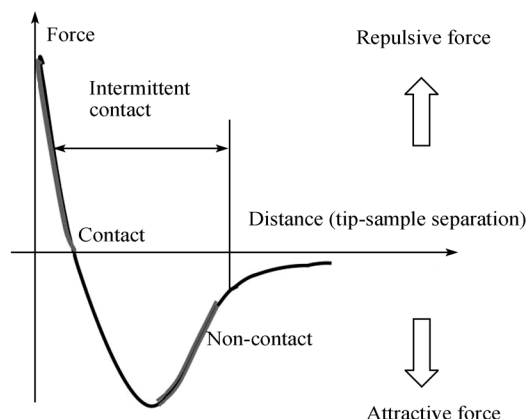


图 2 最常用的 AFM 三种模式发生区域示意图

Fig. 2 Diagram illustrating the four regimes under the three most common AFM imaging modes

接触模式发生在图 2 中的排斥力区域。所谓接触模式, 是探针与样品表面紧密接触, 通过反馈系统来调节悬臂的偏转程度, 从而保证样品与针尖之间的作用力恒定, 当沿 X, Y 方向扫描时, 记录 Z 方向上扫描管移动的距离, 得到样品的表面形貌图像。接触模式能够得到稳定、分辨率较高的图像, 一般适用于表面硬度大, 平坦且非常光滑的样品表面。接触模式的缺点在于: 第一, 当扫描横向较陡的样品时, 易发生内侧力, 容易破坏探针或者样品; 第二, 由于探针在样品表面滑动容易产生粘附力, 使图像的分辨率下降; 第三, 由于探针针尖与样品存在很大的作用力, 使得样品发生变形, 增大了探针与样品的接触面积, 造成了样品厚度的随机变化, 因此对柔软的、具有粘性的样品不宜用接触模式^[2]。

轻敲模式发生在图 2 的排斥力-吸引力共有区域。为了克服上述接触模式的缺点, 轻敲模式应运而生。轻敲模式也叫间歇模式^[3](Intermittent mode), 悬臂通过压电陶瓷使其在接近自身的共振频率时发生较大的振幅振荡, 与样品表面发生间歇的接触, 反馈系统通过调节样品与针尖的距离来控制悬臂的振幅和相位, 记录扫描管 Z 方向移动的情况来获得样品形貌图像。由于针尖与样品是间歇性接触, 时间短, 有足够的振幅克服针尖与样品之间的内侧力或粘附力, 分辨率较高。因此, 轻敲模式适用于柔软、易脆、粘附力强的样品。另外轻敲模式还用于相图的扫描。

非接触模式与轻敲模式相似, 只是振荡的振幅比轻敲模式小得多。由于探针与样品之间的长程作用力, 如范德华力和静电力, 可以引起悬臂振荡频率的变化, 通过检测驱动频率和振荡频率之间的偏差, 可以调节悬臂在 Z 方向的位置, 并保证探针与样品表面不接触^[4]。由于在排斥力区域内探针不接触样品, 应将探针与样品的作用面积调节到最小, 以得到较高的表面分辨率, 因此采用这种模式, 对于适当的样品可以得到原子级的分辨率。

对于生物样品扫描, 在大气环境下, 通常使用轻敲模式; 在液体环境下, 最好使用接触模式, 也可以使用轻敲模式。

2 样品的制备

要获得高分辨率的 AFM 图像, 样品制备是非

常重要的步骤之一。对于生物样品来说, 云母片、玻璃及氧化硅都是极好的基底, 其中云母片应用最为广泛, 一般是用胶带纸将干净云母表面剥离, 得到新鲜、平坦且不导电的云母片(最好吹净云母上由于剥离而可能产生的碎片)。

易于形成稳定的二维晶体膜的蛋白质, 可以通过简单的吸附固定, 并可得到分辨率较高的图像^[5,6]。因为云母片、玻璃及氧化硅在中性条件下带负电, 所以像溶菌酶等带正电的蛋白质也很容易通过吸附固定^[7]。在某些二价阳离子(Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 或 Mn^{2+})存在的条件下, 可以用 AFM 观察得到 DNA 照片^[8]。另外, 在某些特定的条件下, 生物分子需要通过共价吸附才能检测到。更详细的样品制备方法可参考文献^[9]。

制备活体细胞的方法有物理和化学法两大类。对于动物细胞, 物理方法是将它们分散, 然后粘附到固体表面, 例如用粘性的蛋白质(骨胶原等)涂抹基底^[10]。也可以使用交联剂(戊二醛等)进行化学固定, 这样可以防止细胞损坏或者细胞被扫描探针带走^[11]。对于细菌、酵母菌这样的微生物细胞在固体表面不分散, 不能通过简单的吸附固定, 而化学方法比较好, 通过聚阳离子预先处理基底或者通过共价键等强的吸附固定^[12]。物理方法主要是通过琼脂凝胶或多孔疏松的膜捕获细胞。琼脂凝胶常用作柔性的基底, 可直接观察样品生长过程^[13]。在多孔疏松的膜中, 细胞能吸附到与细胞大小相近的多孔的聚合物膜中, 如果扫描过程中没有细胞的分离或损坏, 可以进行重复扫描。

3 应用与结果分析

AFM 可在真空、大气、液体及控温条件下对 DNA、RNA、蛋白质、类脂、碳水化合物、生物分子及菌类等^[14-17]生物样品进行探测, 得到样品表面的结构、性质及动力学等方面的信息, 对样品进行定性或者定量分析。

3.1 AFM 形貌图和相图

对于不同的样品, 采用不同的扫描模式进行形貌扫描, 得到高分辨率的形貌图, 结合这些图像可对样品进行定性或者定量分析。

与 SEM 相比, AFM 在生物样品研究中具有明显的优势, 因为它可在空气或者各种近生理条件中直接探测生物样品的表面性貌和结构特征, 而且具有

极高的成像分辨率, 横向分辨率可达 $0.1 \text{ nm} \sim 1 \text{ nm}$, 纵向分辨率可达 $0.01 \text{ nm} \sim 0.2 \text{ nm}$ 。例如, AFM 在不同条件下对各种 DNA 进行形貌扫描, 可得到 DNA 的质粒结构、环状结构、单链结构、双链结构等。在近生理条件下, 可以得到各种 DNA 的长度和高度, 观察蛋白质的细微结构和大小, 对于各种细胞的研究, AFM 可以测细胞的长度和宽度, 还能测出细胞膜的离子通道等细微结构。

AFM 可以研究生物样品之间相互作用过程中的形貌变化。例如: 胡怡等人^[18]采用原子力显微镜研究了人血小板与 I 型胶原膜相互作用过程中的形态变化, 发现其内部 α 颗粒释放时带出的蛋白原同样可以导致血小板的聚集。与 I 型胶原膜作用后单个血小板大多处于活化过程中的树突型, 并有着彼此相互聚集的趋势。在每个血小板周围都有许多分泌物, 这些分泌物有着不断向血小板扩散的趋势, 而且扩散的方向多指向另一血小板。AFM 形貌扫描还可为某些生物分子作用机制研究提供新信息。例如: Bozec 等人^[19]用 AFM 研究了自然状态下矿物质溶解暴露出的骨和牙质胶原的图像, 对其在完全矿化和破骨细胞调节骨吸收后的形貌进行研究, 表明 AFM 原位分析骨胶原质的形貌性质可用来研究骨骼组织机械性能减弱的作用机制。

具有不同机械性能和粘附性的样品, 在驱动频率和悬臂的实际频率之间, 相信号振荡频率产生滞后现象, 这种图像将和形貌图一起产生, 称为相图^[20,21]。相图一般运用轻敲模式得到。由于粘度、扫描速度、卸载力及样品表面形貌和物质性质等参数的影响^[21,22], 相图只能够显示样品表面材料性质的变化, 提供定性分析的数据, 很难进行定量分析。

对形貌图而言, 相图具有辅助说明的作用。相图能够给出高度图或者振幅图中看不到或者很少看到部分。在相图中, 亲水区域比疏水区域颜色暗, 柔软的区域比硬的区域暗。图 3 为空气中细胞溶解泡囊的高度图(A)和相图(B), 图(B)具有两块很明显的相区, 中心区域的有大块面积的颜色暗为一相, 而周边颜色亮为一相, 这是因为扫描过程中泡囊被破坏, 而内泡有蛋白多糖, 具有亲水性和粘附性, 而外泡没有蛋白多糖, 但在高度图(A)中没有看到这样的差别, 因此高度图不能得到样品表面的准确信息。有时样品的形貌图不容易鉴别, 运用相图可以得到较好的结果, 例如, 通常在大气或者液体条件

下, DNA 的高度图和相图是相同的,但在某些情况下,样品中的水分或者探针的影响,运用高度图无法很好的识别 DNA,此时运用相图就能很好的识别 DNA 的形貌。Holland 等人^[23]发现高度图无法分辨出固定在低密度聚乙烯的纤维蛋白原,而相图则成功地表征了纤维蛋白原的分散状态。利用 AFM 相图可以清楚地分辨出人类精子脱膜后头部边缘残留的膜块,而高度图则无法分辨^[24]。

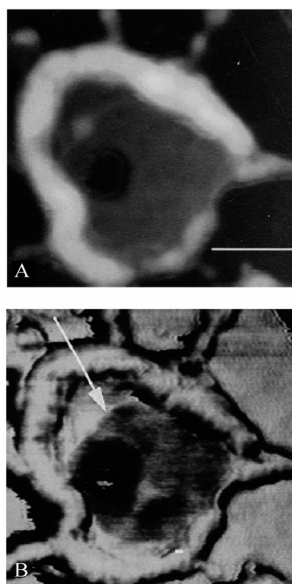


图 3 细胞溶解突触泡在空气中的高度图(A)和相图(B)
Fig. 3 Height mode image Phase mode image of lysed synaptic vesicle in air

3.2 力曲线

力曲线的检测是 AFM 主要用途之一,AFM 能够定量分析探针针尖与样品表面之间的皮牛级作用力,应用于分子间相互作用的检测,包括微米级和纳米级材料的机械性能,例如表面粘合力^[25,26]、表面的吸引力和排斥力^[27,28]、生物分子结合力的性质^[29]。

力曲线可以用许多形式表示。最常用的形式是力-距离曲线。在力-距离曲线中,纵轴表示悬臂受到的力,它是由虎克定律来计算悬臂的偏折而产生的力($f = -k \cdot d$, k 是悬臂的弹性常数, d 是悬臂偏折的距离),横轴为扫描管的伸缩距离。在接触区,接触点 (Zero separation distance) 由力曲线的垂直部分的位置确定,因为仪器没有提供针尖与样品分离距离的测定方法,当表面的长程作用力或样品形变占主导地位时,如细胞表面,接触点的确定就比较困难。记录样品表面性质另一种常用方式为力-体积曲线,它

是在确定的 XY 面的某个点或者多个位置进行力的测定,对于定量测量力的大小,必须对悬臂的弹性常数进行校正,通常使用的方法为几何或者热力学方法^[30]。

图 4 为典型的力-距离曲线图。当探针与样品距离较大时,二者的相互作用力为零(A),悬臂没有偏折。当针尖接触样品时,排斥力使悬臂向上弯曲(B),直到靠近样品表面。这种接触过程可以用于测量表面力,包括范德华力和静电力、溶解作用、水合作用及桥键作用。理论上,将探针从样品上撤离也会造成探针同样程度的偏折,而实际上,在样品上发生的力学行为取决于样品的硬度。在硬度大而不变形的样品表面,力曲线为垂线(C),而在柔软的表面,由于产生凹陷,使力曲线发生变化,得到图中 C' 的形状。用适当的理论方法分析这种行为,可获得样品的粘弹性信息。从样品上撤回探针,力曲线出现了滞后现象,称为粘合力(D),这常用来估计样品的表面能或者互补生物分子之间的结合力。在有长而柔韧性的分子存在时,由于延长力的吸引而可能产生非线性力曲线(D')。

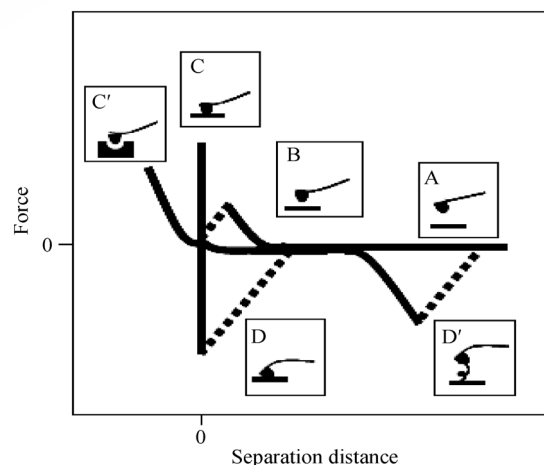


图 4 典型力-距离曲线图
Fig. 4 The force vs. distance curve

目前研究较多的受体与配体之间的作用主要是外援凝聚素和互补碳水化合物之间的作用,他们调节细胞的相互作用,对活性有机体的诱发感染、促进类聚效应、控制差异等不同过程的控制起重要作用。例如, α -甘露糖基和 α -葡糖基的结合导致植物中外援凝聚素伴刀头豆球蛋白 A 有显著的凝聚性。在低聚葡萄糖多聚己糖修饰探针和伴刀头豆球蛋白 A

修饰基底之间使用 4000 皮牛/秒地卸载速度来记录力曲线, 大多数的撤出曲线表明非键合力约为 100 皮牛^[31], 再用甘露糖或者羟基修饰的探针测量, 没有观察到粘附力, 表明这种粘附力来源于单个外援凝聚素和碳水化合物分子之间特定相互作用。

细菌病原体致病通常是细菌表面细胞粘合分子之间相互作用引起的。例如, 结核病由结核丝杆菌经由肝素-血胶精粘附素(HABA)结合, 而粘附在上皮细胞的硫酸乙酰肝上造成的。为了探索单个的 HABA 之间的结合力, 在涂 HABA 探针针尖与涂敷有肝素的基底之间记录力曲线^[32], 使用 10000 皮牛/秒卸载速度, 所记录的力曲线表明粘附力为柱状双峰分布, 峰的平均值分别为 50 皮牛和 117 皮牛, 这是由 HABA 和肝素之间的作用力造成的。用肝素或者牛血清蛋白修饰探针针尖来代替 HABA 修饰的探针针尖时, 粘附力明显下降。Pereira 等人^[33]也测定了(Nimodipine)修饰的 AFM 针尖与植物酵母(*Cerevisiae*)活细胞之间的黏附力。Razatos 等人^[34]用 AFM 研究了细菌 *E. coli* 的黏附作用, 发现黏附力受 *E. coli* 细胞表面的核心脂多糖长度和生成荚膜异多糖酸的影响。这些结果表明在细胞粘附过程中分子机理的研究中力曲线是非常有用的手段。力曲线在研究基于单细胞与单分子技术的细胞与环境界面相互作用也取得了许多进展^[35]。

3.3 动力学分析

AFM 可以在接近生理条件溶液中, 观察生物分子之间的组装和相互作用的动态过程。研究这些动力学过程, 有利于生物结构和功能的研究, 也可进行定性或者定量分析。例如 Argaman 等人^[36]研究了在溶液中, 以 DNA 为模板, 由 *E. coli* RNAP 诱导 RNA 的合成过程。Bezanilla 等人^[37]在有 Ni^{2+} 离子存在的溶液中, 运用轻敲模式来研究脱氧核糖核酸酶 I 降解 DNA 的过程。这些定量动力学性质通过慢速拍摄(Time-lapse)AFM 获得, 例如, *E. coli* rnap 的扫描速度每秒为 1.5 个核苷酸, 这比溶液中速度慢 3 倍^[38]。

实时 AFM(Real-time AFM)可对个体生物分子组装相关的结构构型和作用态进行的定性分析^[39]。目前, 这方面主要有三磷酸腺苷、钙和二氧化碳调节细胞核膜孔结构的研究^[40,41], 这些研究表明三磷酸腺苷和钙诱导孔收缩, 方便了大分子在核仁和细胞液之间传输, 但是二氧化碳会诱导孔的塌陷与核

心的分离。Li 等人^[42]报道了采用 AFM 实时观测 DNA 与三磷酸腺苷(RecA-DNA-ATP γ S)复合物的分解过程, 表明 AFM 可用于 DNA 分子反应过程研究。Kobayashi 等人^[43]采用高速 AFM 实时观测了抗生蛋白链菌素结合/离解成 DNA 的过程, 表明 AFM 在分子反应机理研究中可望发挥作用。

3.4 其它用途

AFM 除对样品表面形貌表征, 表面性质的分析及对生物活体进行动态研究外, 还可以对原子、分子进行纳米级操作和加工。例如, AFM 对 DNA 进行切割, 对切割片段进行获取。对生物分子的纳米操纵, 成为新的生物学方法, 可以获得生物大分子的新信息, 也为生物大分子的应用展示了更广阔的前景。另外, AFM 成像和操纵的联合使用, 使得人们可以从宏观到单分子尺度上, 对生物系统进行精确、可控的修饰和研究。

4 结论与展望

AFM 可在不同环境下, 运用不同模式得到生物样品的表面形貌, 表面性质及动力学过程等信息, 已经成为生物研究领域不可缺少的工具。通过 AFM 相貌图并辅以相图可以更加真实地反映样品表面结构, 力曲线可用于研究生物样品分子间皮牛级作用力的大小, 并为生物样品的分子间作用机理提供有力证据, 同时可以研究生物分子之间的相互作用的动力学过程, 可望在生物分子反应机理研究方面发挥作用, 通过对生物样品的操作和加工, 可实现对生物系统的微观精确调控。随着人们对 AFM 在生物领域中应用研究的深入, 必将促进生物科学发展进入新的时代。

与此同时, AFM 也存在很多局限性。探针是 AFM 的核心部件之一, 直接决定图像的分辨率, 锥形等几何构型的探针具有增宽效应, 针尖容易钝化、污染, 虽然在液体中成像, 探针被自然清洗, 但针尖与样品发生作用的同时, 与液体也发生作用, 而且针尖会被水膜包裹, 这些都会使图像的信噪比减弱, 导致图像分辨率降低, 样品的表面张力, 水分子膜及静电力等因素也会影响图像的分辨率。与 SEM 相比, AFM 成像速度对图像的分辨率也存在很大的影响。这些缺陷都需要新技术来弥补。

近年来, 随着科学技术的不断改进和发展, 新的 AFM 操作模式如磁场操作模式(MAC-AFM)^[44]、

频率-力调节模式(FFM-AFM)^[45]、频率-振幅调节模式(FAM-AFM)^[46]等不断涌现,使得 AFM 测试所得的图像数据更接近真实情况,而且对样品的破坏降低到最低程度。另一方面,AFM 与其他技术联用(扫描电子显微镜 SEM、透视电子显微镜 TEM、X-射线衍射及核磁共振 NMR 等),将进一步提高对生物样品结构的研究能力,AFM 的功能及应用范围也将会不断扩展和更加深入,必将对科学的进步发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, **56**(9): 930–933.
- [2] Johnson DJ, Miles NJ, Hilal N. Quantification of particle–bubble interactions using atomic force microscopy: A review. *Adv Colloid Interf Sci*, 2006, **127**: 67–81.
- [3] Hsundms HG, Cleveland JP, Radmacher M, *et al.* Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl Phys Lett*, 1994, **64**(13): 1738–1740.
- [4] Lüthi R, Meyer E, Howald L, *et al.* Progress in noncontact dynamic force microscopy. *J Vac Sci Technol B*, 1994, **12**(3): 1673–1676.
- [5] Müller DJ, Amrein M, Engel A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *J Struct Biol*, 1997, **119**: 172–188.
- [6] Müller DJ, Engel A, Amrein M. Preparation techniques for the observation of native biological systems with the atomic force microscope. *Biosens Bioelectron*, 1997, **12**(8): 867–877.
- [7] Raab A, Han W, Badt D, *et al.* Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 902–905.
- [8] Hansma HG, Laney DE. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys J*, 1996, **70**: 1933–1939.
- [9] Kirat EK, Burton I, Dupres V, *et al.* Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *J Microsc*, 2005, **218**: 199–207.
- [10] Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi DS. Actin filament dynamics in living gial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, 1992, **257**: 1944–1946.
- [11] LeGrimellec C, Giocondi MC, Lenoir M, *et al.* High-resolution three-dimensional imaging of the lateral plasma membrane of cochlear outer hair cells by atomic force microscopy. *J Comp Neurol*, 2002, **451**: 62–69.
- [12] Schaer-Zammaretti P, Ubbink J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy*, 2003, **97**: 199–208.
- [13] Gad M, Ikai A. Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. *Biophys J*, 1995, **69**: 2226–2233.
- [14] Bustamante C, Vesonka J, Tang CL, *et al.* Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 1992, **31**: 22–26.
- [15] Isralewitz B, Gao M, Schulten K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**: 224–230.
- [16] Balashev K, Jensen TR, Kjaer K, *et al.* Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie*, 2001, **83**: 387–397.
- [17] Marszalek PE, Li H, Fernandez JM. Fingerprinting polysaccharides with single-molecule atomic force microscopy. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 258–262.
- [18] 胡 怡, 蔡继业, 吴扬哲, 等. 原子力显微镜观测人血小板与 I 型胶原膜相互作用过程中的形态学变化. *中国纺织工程与临床康复*, 2007, **11**(9): 1647–1650.
- [19] Bozec L, de Groot J, Odlyha M, *et al.* Atomic force microscopy of collagen structure in bone and dentine revealed by osteoclastic resorption. *Ultramicroscopy*, 2005, **105**: 79–89.
- [20] Schmitz I, Schreiner M, Friedbacher G, *et al.* Phase imaging as an extension to tapping mode AFM for the identification of material properties on humidity-sensitive surfaces. *Appl Surf Sci*, 1997, **115**: 190–198.
- [21] McLean RS, Sauer BB. Tapping-mode AFM studies using phase detection for resolution of nanophases in segmented polyurethanes and other block copolymers. *Macromolecules*, 1997, **30**: 8314–8317.
- [22] Loos J. The art of SPM: scanning probe microscopy in materials science. *Adv Mater*, 2005, **17**: 1821–1833.
- [23] Holland NB, Marchant RE. Individual plasma proteins detected on rough biomaterials by phase imaging AFM. *J Biomed Mater Res*, 2000, **51**: 307–315.
- [24] Hansma HG, Garcia RA, Argaman M, *et al.* Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. *J Struct Biol*, 1997, **119**: 99–108.
- [25] Weisenhorn AL, Maivald P, Butt HJ, *et al.* Measuring adhesion, attraction, and repulsion between surfaces in liquids with an atomic-force microscope. *Phys Rev B*, 1992, **45**(19): 11226–11233.
- [26] Roberts CJ. What can we learn from atomic force microscopy adhesion measurements with single drug parti-

- cles? *Eur J Pharm Sci*, 2005, **24**: 153–157.
- [27] Burnham NA, Dominguez DD, Mowery RL, *et al.* Probing the surface forces of monolayer films with an atomic-force microscope. *Phys Rev Lett*, 1990, **64**(16): 1931–1934.
- [28] Gillies G, Kapple M, Butt HJ. Surface and capillary forces encountered by zinc sulfide microspheres in aqueous electrolyte. *Langmuir*, 2005, **21**: 5882–5886.
- [29] Allen S, Chen X, Davies J, *et al.* Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope. *Biochemistry*, 1997, **36**: 7457–7463.
- [30] Burnham NA, Chen X, Hodges CS, *et al.* Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology*, 2003, **14**: 1–6.
- [31] Touhami A, Hoffmann B, Vasella A, *et al.* Probing specific lectin-carbohydrate interactions using atomic force microscopy imaging and force measurements. *Langmuir*, 2003, **19**: 1745–1751.
- [32] Dupres V, Menozzi FD, Loch C, *et al.* Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesions on living bacteria. *Nat Methods*, 2005, **2**: 515–520.
- [33] De Souza Pereira R, Da Silva MN, Cotta MA. Adhesion forces measured between a calcium blocker drug and its receptor in living cells using atomic force microscope. *Febs Lett*, 2003, **552**: 155–159.
- [34] Razatos A, Ong YL, Shama MM, *et al.* Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 11059–11064.
- [35] Camesano TA, Liu Y, Datta M. Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques. *Adv Water Resour*, 2007, **30**: 1470–1491.
- [36] Argaman M, Golan R, Thomson NH, *et al.* Phase imaging of moving DNA molecules and DNA molecules replicated in the atomic force microscope. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4379–4384.
- [37] Bezanilla M, Drake B, Nudler E, *et al.* Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophys J*, 1994, **67**: 2454–2459.
- [38] Guthold M, Zhu X, Rivetti C, *et al.* Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophys J*, 1999, **77**: 2284–2294.
- [39] Stolz M, Stoffler D, Aepli U, *et al.* Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 2000, **131**: 171–180.
- [40] Rakowska A, Danker T, Schneider SW, *et al.* ATP-induced shape change of nuclear pores visualized with the atomic force microscope. *J Membr Biol*, 1998, **163**: 129–136.
- [41] Oberleithner H, Schillers H, Wilhelmi M, *et al.* Nuclear pores collapse in response to CO₂ imaged with atomic force microscopy. *Pflugers Arch*, 2000, **439**: 251–255.
- [42] Li BS, Sattin BD, Goh MC. Direct and real-time visualization of the disassembly of a single RecA-DNA-ATPγS complex using AFM imaging in fluid. *Nano Lett*, 2006, **6**(7): 1474–1478.
- [43] Kobayashi M, Sumitomo K, Torimitsu K. Real-time imaging of DNA-streptavidin complex formation in solution using a high-speed atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 2007, **107**: 184–190.
- [44] Ge G, Han D, Lin D, *et al.* MAC mode atomic force microscopy studies of living samples, ranging from cells to fresh tissue. *Ultramicroscopy*, 2007, **107**: 299–307.
- [45] Solares SD. Single biomolecule imaging with frequency and force modulation in tapping-mode atomic force microscopy. *J Phys Chem B*, 2007, **111**: 2125–2129.
- [46] Solares SD. Eliminating bistability and reducing sample damage through frequency and amplitude modulation in tapping-mode atomic force microscopy. *Meas Sci Technol*, 2007, **18**: 592–600.