

文章编号 :1000-6281 (2008) 05-0395-05

# 原子力显微镜在液相条件下的成像分析

张天彪,党国全,关一夫\*

(中国医科大学生物化学与分子生物学教研室,辽宁 沈阳 110001)

**摘 要:** 本研究利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)分别对  $\text{Al}_2\text{O}_3$  纳米模板、云母片及数字光盘在固相及液相条件下进行形貌扫描和云母片上的力-距离曲线测量。实验结果分析表明液相条件可以降低针尖的展宽效应,使得形貌成像更能够显示出物体的细微结构。在液相条件下,由于样品表面消除了静电效应和液体的阻滞力结果,力-距离曲线显示了较好的力均一性。这些结果为 AFM 实验技术研究生理条件下的生物样品的形态学及生物分子之间的相互作用力提供了实验可行性。

**关键词:** AFM;液相;形貌图像;力-距离曲线

**中图分类号:** Q13;TG15.21<sup>+</sup>5.7 **文献标识码:** A

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是一种源于扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)的扫描探针显微镜,它已广泛应用于机械学、材料学、电子学及分子操纵等领域对微观尺度的结构进行分析和检测<sup>[1]</sup>。与其它显微检测技术相比,AFM 的最大优点是不受被测样品导电性的限制,这为 AFM 在生命科学和生物医学领域中开拓更广阔的应用前景提供了可行性<sup>[2]</sup>。利用 AFM 扫描获得样品形貌学信息,不仅对样品没有特殊的要求,且制备样品方便简单,避免了利用电子显微镜观察时所必需的真空条件和必需的样品前期处理工作。此外,利用 AFM 分析和检测样品不会破坏被测样品<sup>[3]</sup>,经 AFM 检测的样品还可用于其它的生化实验和临床诊断,这就避免了大量的珍贵生物样品和临床标本的浪费,可以极大地提高样品的利用率。

目前 AFM 在生物领域中的应用主要集中在测量病理组织及细胞的表面形貌,所采取的手段多是应用一些固定剂将细胞固定在固体表面上,待其干燥后,利用 AFM 探针对固定的细胞进行扫描来获取形貌学信息<sup>[4,5]</sup>。但是,以此方法固定的细胞完全脱离了细胞存活的生理环境,很难具有生物活性,所得到的图像不能反映出细胞的真实形貌。为开拓 AFM 在生物学及基础医学中的应用,作者开展了一系列初步试验,研究如何在液相条件下获取生物样品和医学标本的 AFM 图像,研究如何检测液相条件下细胞表面的力学特性及胞吞/胞吐的动态过程。

本文报道了利用 AFM 对一些材料在气相及液相条件下进行形态学的测量以及探针力-距离曲线测量的初步结果,为今后利用 AFM 研究在生理条件下生物样品的形态学、生物分子之间的相互作用力及生物反应过程中的动力学奠定初步的实验基础。

## 1 材料与方法

本实验中作为形貌学研究的材料是用于制备纳米线阵列的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  纳米孔模板<sup>[6]</sup>、光盘碟片(CD-R)和数字通用光盘(DVD-R)。本实验使用的 AFM 为北京本原纳米仪器有限公司的产品(CSPM4000)。原子力探针是 Budget Sensors 公司生产的氮化硅探针(ContAL),微悬臂长 450  $\mu\text{m}$ ,力常数 0.2 N/m,针尖曲率半径约 10 nm。利用接触模式(contact mode)对被检测样品进行扫描以获得形貌图像。最大扫描范围 5  $\mu\text{m}$   $\times$  5  $\mu\text{m}$ ,扫描图像像素 512  $\times$  512,扫描频率 1 Hz。AFM 扫描图像经自动平滑处理后消除低频噪音。之后利用 CSPM4.6 Imager 软件对图像信息进行表面形貌和尺度的分析。

用于液相条件下的样品池为圆形陶瓷材料,通过磁力固定在石英晶体扫描器上。在进行液相条件下形貌图像扫描时,将待测样品静置在液体样品池中,然后加入去离子水直到液面完全覆盖样品。为减少液体中所含其它物质颗粒的影响,配制所有试剂的液体均是经过滤膜过滤的去离子水。为使得在两种不同的条件下测量的结果具有可比性,在液相

收稿日期:2008-06-17;修订日期:2008-07-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30570478)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 30570478)。

作者简介:张天彪(1978-),男(汉族),辽宁省沈阳人,讲师,在读博士研究生。

\*通讯作者:关一夫(1955-),男(满族),辽宁省沈阳人,教授,博士研究生导师。E-mail: yfguan@mail.cmu.edu.cn.

条件下的工作参数尽可能接近气相条件下的工作参数。但为了获得高质量的 AFM 图像,本文在实际测量中对实验参数进行了适当的优化和调整。

本实验中用于探针力 - 距离曲线测量的材料是普通的天然云母片。利用接触模式(contact mode)进行探针力 - 距离曲线的测量,在操作界面中,选择“力曲线”,进行力 - 距离的测量;选择“点测量模式”,以便进行各个不同点数据的收集,采集点数:150。

## 2 结果

图 1 和图 2 分别是普通 CD 光盘和 DVD 光盘在气相和液相下的 AFM 扫描得到的表面形貌图像(a-气相条件;b-液相条件)。图像显示液相条件下获得的 AFM 图像要优于气相条件下的图像,消除了边缘的毛刺,使得沟槽与高峰部位的界限更加明显,细微结构更加突出。

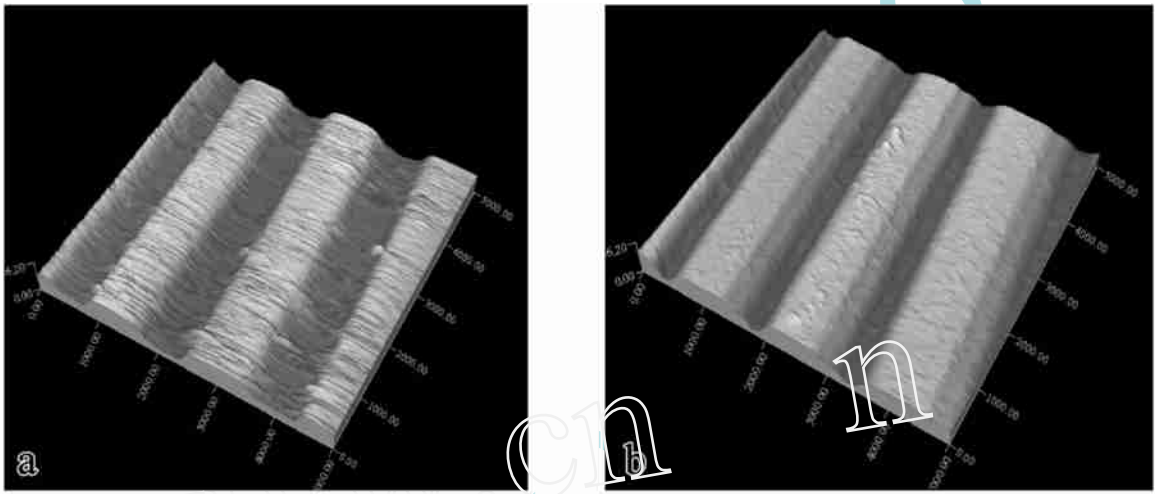


图 1 光盘碟片在气相(a)和液相(b)条件下的 AFM 形貌图像。

Fig.1 The AFM images of the CD in air (a) and in liquid (b).

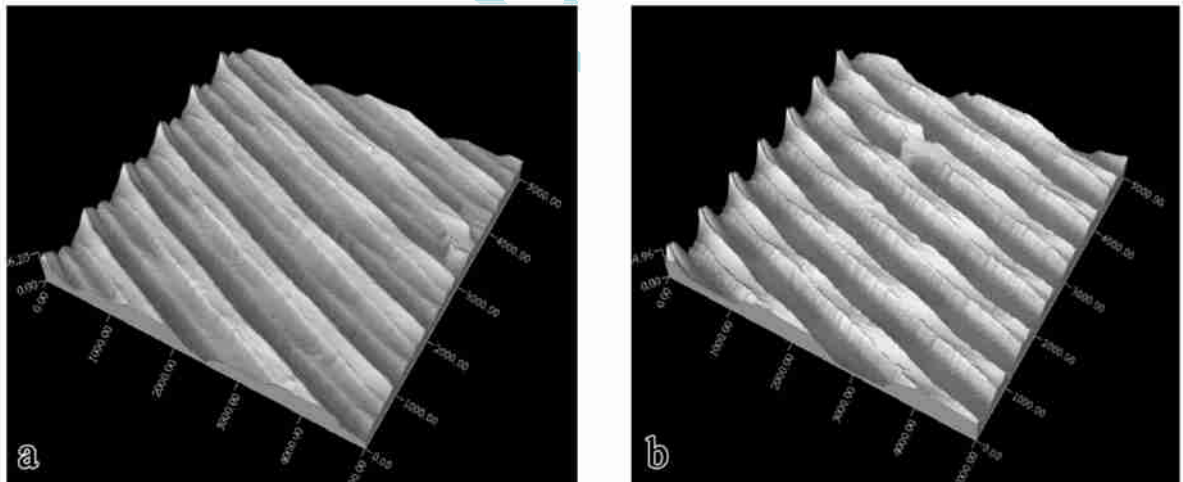


图 2 DVD-R 在气相(a)和液相(b)条件下的 AFM 形貌图像。

Fig.2 The AFM images of the DVD-R in air (a) and in liquid (b).

图 3a 和图 3b 是  $\text{Al}_2\text{O}_3$  纳米孔模板在气相和液相下的 AFM 图像,它们清晰地显示了分布比较均匀的近似六边形的纳米孔结构。这种结构与同样  $\text{Al}_2\text{O}_3$  纳米孔模板的扫描电镜图像是一致的(图

3c)。比较图 3a 和图 3b 可看出,在气相条件下得到的 AFM 图像中,纳米孔的边缘比液相条件下的 AFM 图像模糊。在气相和液相下纳米孔的直径分别测量为  $63.04 \text{ nm} \pm 5.58 \text{ nm}$  和  $70.36 \text{ nm} \pm 7.03 \text{ nm}$ 。

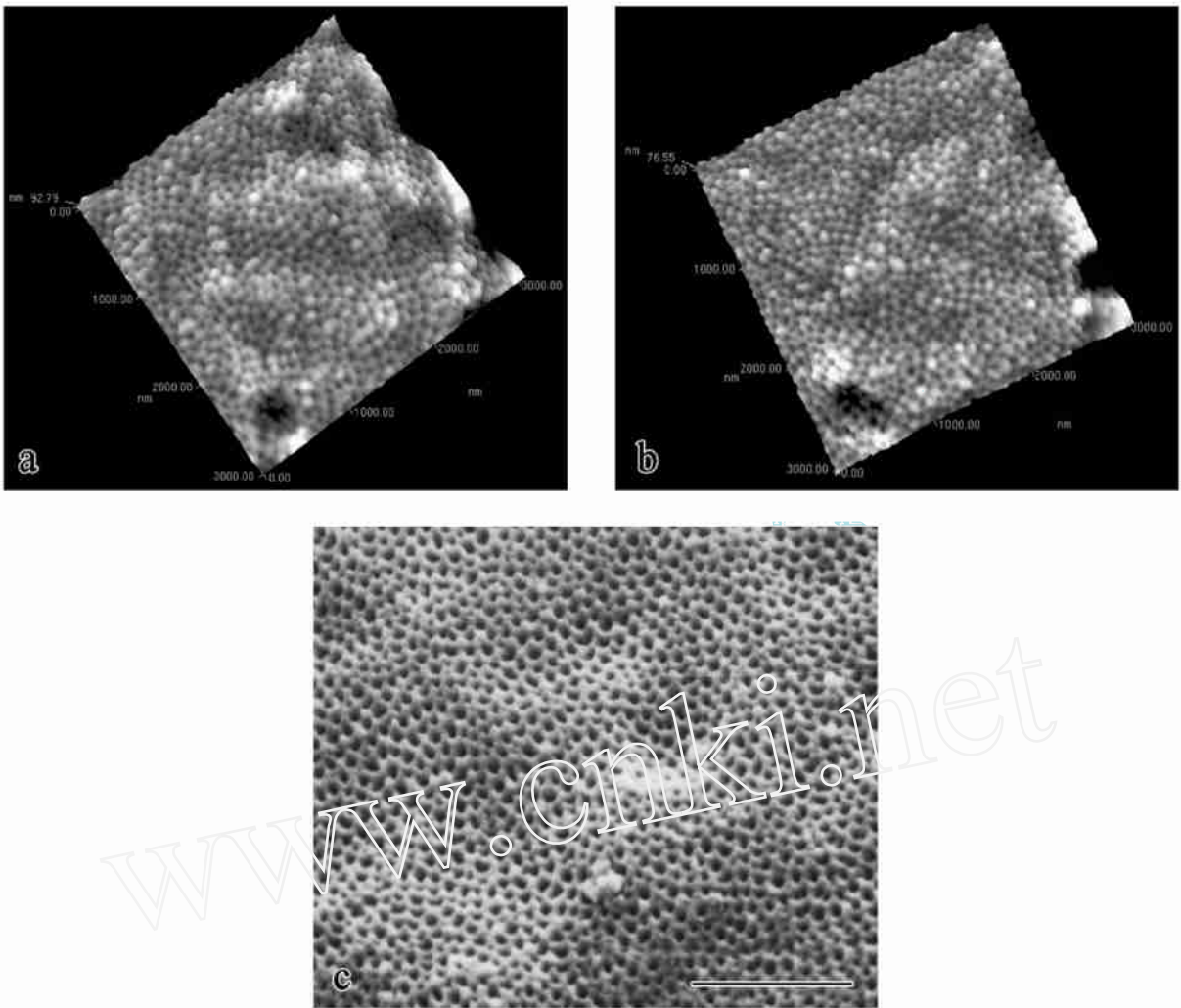


图 3 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米模板在气相和液相条件下的 AFM 形貌图像 (a 和 b), 以及扫描电子显微镜的图像 (c)。Bar = 1 μm  
 Fig. 3 The AFM images of the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-structured template in air and in liquid (a and b), and its SEM image (c). Bar = 1 μm

图 4 是测得的云母片在气相和液相条件下得到的探针力 - 距离曲线, 图中的箭头分别代表了探针的进针方向和退针方向。通过探针针尖的形变量, 可以根据以下公式计算出作用在云母片表面上的力。

$$F = k \times (x), \quad x = S_z \times \text{Sensitivity} \times (V_z - V_z)$$

其中,  $k$  是探针的力常数,  $x$  是探针的形变量,  $S_z$  是扫描器伸缩系数,  $V_z$  和  $V_z$  分别是 AFM 探针在进针终点和进针起始点时所对应的电压值 ( $Z$  坐标轴)。由图 4 的数值, 可以计算出在气相条件和液相条件下探针与云母片之间的相互作用力 (表 1)。

### 3 讨论

图 2、图 3 和图 4 的 AFM 图像显示, 无论 CD 和 DVD 或 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米孔模板, 它们液相条件下的 AFM

表 1 气相和液相条件下云母片表面的作用力

Table 1 The atomic force between mica surface in air and in liquid

	$F_{(CD)}$	$F_{(EF)}$	斜率 (C-D)	斜率 (D-E)
气相	3.8072 ± 0.4569 nN	0.0331 ± 0.0036 nN	0.055	0.052
液相	7.3510 ± 0.8086 nN	0.1329 ± 0.1595 nN	0.133	0.133

图像都比气相条件下的 AFM 图像清晰, 更能够揭示出样品的精细结构。本文将液态条件下获得高清晰度 AFM 图像的原因归纳如下。首先, 当固体样品暴露在大气环境中时, 大多数样品的表面都会吸附一个厚度为几纳米的覆盖层 (凝聚的水蒸气或其它有机污染物)。AFM 探针在进针过程中, 当 AFM 探针刚刚接触到这个吸附层时, 吸附层将产生一个向下的毛细作用力将探针吸入吸附层内, 增加了探针对

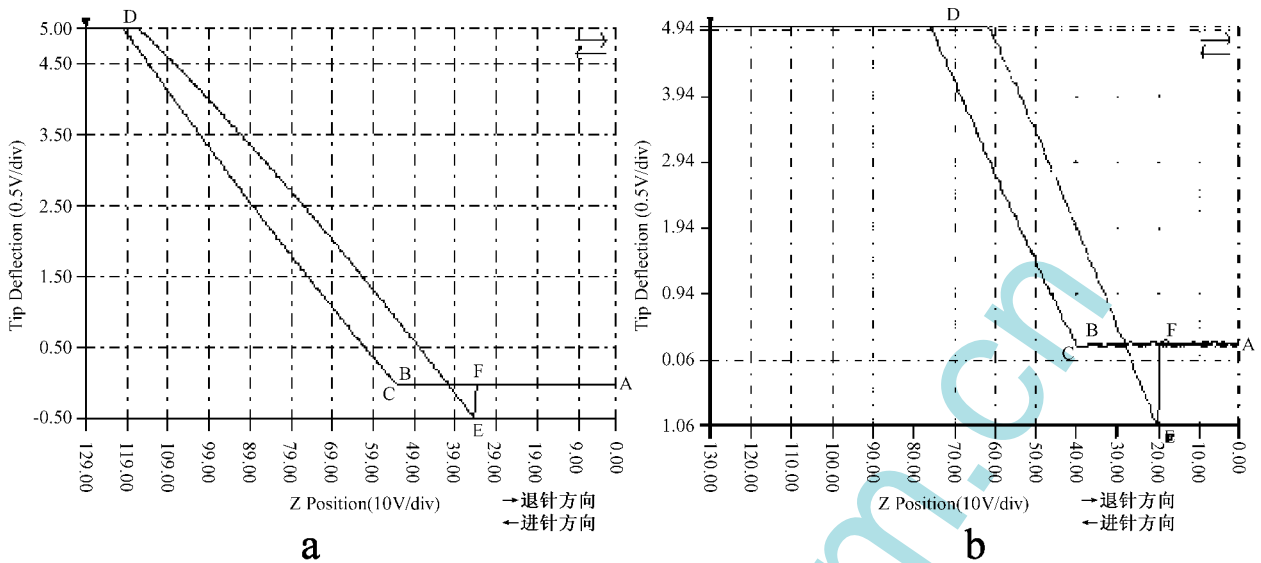


图 4 AFM 探针在气相 (a) 和液相 (b) 条件下对云母片表面进行力 - 距离曲线测量。

Fig. 4 The measurement of the force-distance curve between the mica surface and the pinpoint in air (a) and in liquid (b).

样品的总作用力。但当样品置于液体中时,由于探针和样品完全浸泡在液体里,不存在毛细作用,大大减小了检测时样品对探针的吸引力<sup>[7]</sup>。其次,在大气条件下,固体样品的表面常常会附着一些静电荷,AFM 探针因受到该静电场作用而极化,产生额外的粘附力,这也会增加样品对探针的作用力。在液相环境中,样品表面的静电荷会消散,或者因使溶液在界面产生极性相反的离子层而被屏蔽,有效地消除了因样品带有静电而产生的影响。由于静电力和表面毛细的共同作用,AFM 探针可以产生一定的展宽效应,使得被测物体的尺度与真实的略有不同。图 3a 和图 3b 的 AFM 图像显示,同一模板上的纳米孔的直径在气相和液相条件下分别测得为  $63.04 \pm 5.58 \text{ nm}$  和  $70.36 \pm 7.03 \text{ nm}$ ,都小于图 3c 的 SEM 图像中的纳米孔直径 ( $70.85 \pm 5.58 \text{ nm}$ )。这些结果表明 AFM 探针在气相条件下产生的展宽效应要大于液相条件下的展宽效应,因此在液相条件中所得的图像更能反映出被测物体的真实尺度。

在液相条件下采集 AFM 图像具有挑战性。AFM 图像的质量还与样品本身特性密切相关。一般而言,硬度越高的物体,它的 AFM 图像也就越清晰。但是,对于生物样品,液相条件下和气相条件下的 AFM 图像会大不相同。在液相条件下采集 AFM 图像,首先需要将生物样品固定在基片上<sup>[4]</sup>。此外,在近于生理条件下的液体中,细胞以及蛋白质还会具有一定的活性,因此细胞表面会表现出一定的弹性,生物分子(蛋白质或 DNA)的空间构象也处在一个动态平衡过程中。这些都会使得生物分子的

AFM 图像的清晰度降低。但在气相条件下,脱水的细胞表面表现出一定的硬度,蛋白质的空间结构也变得相对稳定。因此,在液相条件下采集具有生物活性的生物样品的 AFM 图像具有一定的难度。

其次,在液相条件下采集 AFM 图像时,AFM 探针要完全浸没在液体中。在信号采集过程中,用来检测 AFM 悬臂弯曲程度的反射激光束要经过液体后才能被光电倍增管接收到,因此液体表面上任何一点微震都可以产生扰动信号,降低 AFM 图像的分辨率。本文在试验过程中,除了加强减震措施外,还考察了扫描频率对 AFM 图像的影响。通过实验,决定采用最低扫描频率 1Hz 来获得 AFM 图像,从而可以将液面的干扰效应降低。

云母是一种天然的层状矿物,具有很好的绝缘性和导热性,化学性质稳定,在云母片中的原子排列具有特征性的六方环结构,因而常用来检测 AFM 的性能。此外,由于云母片的剥离面的缺陷少,平整范围较大,具有较好的表面平整度,因此它也是 AFM 研究吸附样品时最常用的基底材料。

为了给下一步利用 AFM 探针测量液相条件下生物分子之间相互作用力奠定可靠的实验基础,本文首先利用云母片作为基底材料来考查 AFM 探针与云母片之间的作用力。图 4 是分别在气相和液相条件下 AFM 探针在云母片表面上的力 - 距离曲线。图中的 A 点 B 点是探针针尖接触到云母片表面前的进针过程。图中的 C 点 D 点是探针针尖接触到云母片表面后继续进针的过程,也是 AFM 探针悬臂的形变过程。根据上述公式计算出的就是探针针尖

形变时所受的作用力。计算结果表明,探针在液相环境中受到的作用力  $F_{(CD)}$  几乎是气相环境中同一进针过程受到的作用力的2倍(分别是7.351 nN和3.807 nN)。其次,作者观察到在液相条件下,AFM探针在进针和退针(D点-E点)过程中力-距离曲线的斜率是平行的,计算出的斜率是0.133。但在气相条件下,AFM探针在进针过程中力-距离曲线的斜率(0.055)略大于退针过程中力-距离曲线的斜率(0.052),这表明气相条件下,探针受到了不同的作用力。第三,图4还显示了在退针过程中当AFM探针脱离云母片表面的瞬间,AFM探针在样品表面的吸附力( $F_{(EF)}$ )也有所不同,他们在气相条件和液相条件下的作用力分别是0.0331 nN和0.1329 nN。这可能是由于处在液体中的样品表面静电和AFM探针脱离云母片表面时液体的阻滞力共同作用的结果。具体的机制还有待于进一步探讨。

综上所述,本文对在液相条件下获取样品AFM图像和探针力-距离曲线进行了初步的尝试。通过比较,发现同一样品在液相条件下的AFM图像优于在气相条件下的AFM图像,能够显示出细微的结构。此外,在液相条件下和气相条件下的探针力-距离曲线也有所不同,这可归结为在气相条件下样品表面的静电效应和液体阻滞力的结果。下一步工作是利用AFM研究在真实生理条件下生物样品的

形态学、生物反应过程中的动力学信息等。

#### 参考文献:

- [1] Binnig G, Quate C, Gerber Ch, et al. Atomic force microscope[J]. Phys Rev Lett, 1986, 56 (4): 930 - 933.
- [2] 郁毅刚,徐如祥,蔡颖谦,等. 原子力显微镜在生命科学中的应用(Application of atomic force microscope in life science research) [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25 (2): 143 - 147.
- [3] Hansma H G, Sinsheimer R L, Gropp J, et al. Recent advances in atomic force microscopy of DNA[J]. Scanning, 1993, 15 (5): 296 - 299.
- [4] 王云起,李国有,蔡继业,等. 人红细胞老化过程中膜表面唾液酸变化的免疫AFM研究[J]. 电子显微学报, 2006, 26 (1): 60 - 63.
- [5] 关维,纪小龙,范丽娜. 原子力显微镜对正常细胞、肿瘤细胞膜表面形态结构的观察[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10 (9): 951 - 955.
- [6] Chang H X, Yuan Y, Shi N L, Guan Y F. Ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on conducting polyaniline nanotube array[J]. Anal Chem, 2007, 79 (13): 5111 - 5115.
- [7] Bonaccorso E, Butt H J. Microdrops on atomic force microscope cantilevers: evaporation of water and spring constant calibration[J]. J Phys Chem B, 2005, 109 (1): 253 - 263.

## AFM images acquired under the liquid condition

ZHANG Tian-biao, DANG Guo-quan, GUAN Yi-fu\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang Liaoning 110001, China)

**Abstract:** In this work we acquired AFM images of the  $Al_2O_3$  nano-structured template, mica, CD and DVD in the solid phase and the liquid phase respectively and measured the force distance curve of the mica surface as well. Comparison shows that the AFM images obtained under the liquid phase condition exhibit the fine structures of the objects due to the reduction of the broadening effect of the AFM cantilever. In addition, the elimination of the electrostatic effect and the resistant momentum of the liquid phase, the force distance curve in the liquid phase displays a better uniformity. These results provide us the possibility that AFM could be applied to the biological or medical samples under physiological conditions for the investigation of the cellular morphology and biological molecular interactions.

**Key words:** AFM; liquid phase; morphology; force-distance curve

\* Corresponding author