

原子力显微镜技术及其在细胞生物学中的应用

鲁哲学 张志凌 庞代文

(武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072. * 联系人, E-mail: dwpang@whu.edu.cn)

摘要 从原子力显微镜的发展、特点、操作模式以及联用技术等方面对原子力显微镜技术作了简要的介绍, 从细胞固定方法、细胞成像、力检测以及细胞操纵等方面综述了原子力显微镜技术在细胞生物学方面的应用, 并对原子力显微镜技术的发展进行了展望。

关键词 原子力显微镜 操作模式 联用技术 细胞生物学

最近几十年来, 纳米尺度上物质的结构、相互作用以及一些特殊的现象等越来越受到关注, 各种研究方法和仪器手段也应运而生, 原子力显微镜(AFM)就是其中的一种, 它是扫描探针显微镜(SPM)家族中的一个重要代表。20 世纪 80 年代初^[1,2], 具有原子级分辨率的表面形貌测试仪——扫描隧道显微镜(STM)在IBM苏黎世实验室问世。由于其可在多种环境下工作, 且制样简单, 因此很快就得到了广泛的应用。然而, 随着STM在表面科学和生命科学领域的广泛应用, 它的一些不足之处如样品必须导电等逐渐暴露出来。在 1986 年, 基于样品-针尖相互作用力的高分辨原子力显微镜(AFM)诞生^[3], 它能获得纳米尺度上物质表面形貌并实现分子间相互作用力的检测, 因此很快在生命科学领域得到了广泛的应用, 无论是生物小分子还是核酸、蛋白质等生物大分子以及细胞方面都有研究报道。本文拟对原子力显微镜及其在细胞生物学方面的应用进行综述。

1 原子力显微镜简介

原子力显微镜通过控制并检测样品-针尖间的相互作用力来实现高分辨成像^[1,4]。首先控制微悬臂顶端的微小针尖, 使其与待测样品表面有某种形式的力接触, 然后通过压电陶瓷三维扫描器驱动针尖或样品作相对扫描, 作用在样品与针尖之间的各种作用力会使微悬臂发生形变, 这些形变可通过光学或电学的方法检测, 最后转化成图像输出(如图 1)。AFM具有以下特点: (1) 待测样品无需导电; (2) 可得到高分辨物体表面的三维形貌; (3) 可以在多种环境(如真空、大气、溶液、低温等)下工作, 特别是在溶液环境下生物样品可保持其自然状态, 从而避免制样过程中所造成的样品变形或变性; (4) 可以进行连续动态分析。它能在接近生理状态条件下观察样品, 因此许多研究者通过对生物样品的连续成像, 以

了解某些生命活动的动态过程。

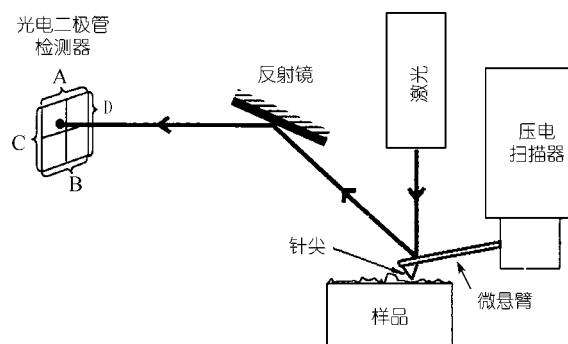


图 1 原子力显微镜成像原理示意图

根据针尖与样品作用方式不同, 原子力显微镜的操作模式主要可以划分为接触式、非接触式和间歇接触式等三种。在接触式模式下, 针尖始终同样品接触并简单地在表面移动, 虽然这种模式可产生稳定、高分辨的图像, 但针尖在表面的移动及针尖-表面间的剪切力可能损伤样品和针尖。而在非接触模式下, 针尖不与样品接触, 因此不会对样品造成污染或损伤, 但分辨率相对不高。间歇接触模式下, 针尖通过振动与样品间断地接触, 减少了剪切力引起的对样品的破坏, 可对柔软、易碎、黏附性强的样品成像, 因此特别适合生物样品研究。在间歇接触模式中, 有两种驱动微悬臂振动的方法。一种是轻敲模式^[5](Tapping Mode), 微悬臂的振动是由扫描头上的压电陶瓷所产生的高频声波驱动。另一种是磁力驱动模式^[6-8](MAC Mode), 具有磁性的微悬臂的振动是通过装在微悬臂附近的一个磁线圈产生的交流磁场来驱动的, 这样可获得更为单纯的微悬臂响应, 而不会激发出轻敲模式所固有的背景噪音, 当在液体环境下工作时这种优势更为明显。

2 联用技术

随着原子力显微术的发展,为了充分发挥其分辨率高以及定位精确等优点,同时弥补其样品寻找困难等缺点,从而拓展其应用范围,原子力显微术与其他技术的结合成为必然的发展趋势。

研究人员通过对针尖进行适当的改造将其他技术整合进来,以适应研究的需要。Manalis小组^[9]直接将一个微小的光寻址电位传感器结合到原子力显微镜的微悬臂针尖上,组合成扫描探针电位仪。这样可以利用原子力显微镜精确的定位机制,在获得样品表面形貌信息的同时测量样品表面特定部位的pH值。

许多研究者将电化学技术和原子力显微镜结合起来,以研究电极表面小分子的吸附、电化学沉积膜的形成和特点以及测定静电力等^[10]。此外还有研究者利用它们对一些生物电化学过程进行了更深入的研究。Kelley等人^[11]通过金电极表面电极电势来控制固定化DNA单层膜取向,认为利用这种性质可以构建电化学纳米开关,并可应用于DNA传感器和纳米电子器件的研究中。这种联用技术也被用于研究肌红蛋白在高定向裂解石墨和自组装双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)膜表面的吸附行为^[12]。

将原子力显微镜与其他一些显微技术结合也是一种发展方向。Vesenka等人^[13]将光学显微镜与原子力显微镜组合起来,利用光学显微镜对样品进行粗略的定位,然后利用原子力显微镜观察样品超微结构和测量其物理特性等,这样就避免了单一使用原子力显微镜时样品寻找的困难等问题。Ikai小组^[14]则将原子力显微镜和全内反射荧光显微镜联用来进行单细胞的研究,通过全内反射荧光显微镜来检验原子力显微镜对细胞进行的操纵情况。两种技术联用之后,使得纳米水平的操纵和高灵敏的单分子定位成为可能,并将在单细胞研究方面得到广泛的应用。而Joachimsthaler等人^[15]则开发出了能安装在扫描电子显微镜中的原子力显微镜,形成了微观分析技术的新一代组合。先在扫描电子显微镜中观察到一个特定区域,锁定目标,然后用原子力显微镜进行原子尺度的观察、精确的高度测量以及一些材料物理特性的测量。

3 细胞生物学应用

细胞是生命体结构与生命活动的基本单位,一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找。目前细胞

生物学研究已从细胞群体深入到单细胞及细胞组分研究,因此需要一些具有高分辨和连续动态分析能力的新技术新方法。而原子力显微镜的出现则正好为细胞结构纳米尺度的观察及一些动态过程的获得创造了条件。在原子力显微镜出现以来短短十几年间,它已经被广泛地应用于生命科学的各个研究领域。借助它可以获得单个生物大分子、细胞的结构信息,对单个生物分子进行操纵;借助它可以进一步了解细胞结构与功能之间的关系;通过它与其他技术(如荧光显微术、扫描电子显微镜等)的联用可以拓宽其应用范围;通过对针尖的修饰^[16,17]可以研究生物分子之间相互作用力,进行反应位点识别成像等。下面将主要对原子力显微镜在细胞生物学方面的应用进行综述。

3.1 细胞固定方法研究

对于原子力显微镜成像而言,样品在基底表面的固定是一个至关重要的问题,对于细胞样品来说尤其如此。如何将细胞样品固定得比较牢固又保持细胞的原始状态是许多研究者关心的重点。

最初的报道中细胞一般都是经过自然干燥固定^[18-24]后在空气介质中进行成像研究。自然干燥固定法是将一定量的细胞样品滴在基底上,然后在空气中自然干燥,干燥后形成一层平整连续的膜。这种固定方法非常简单,但是由于细胞在干燥过程中会脱水,因此对细胞形态等会有一定的影响。

后来,如何在溶液状态下固定活细胞成为许多研究者工作的重点。有研究者利用静电相互作用或共价交联等方法来固定细胞样品^[25-27]。Bolshakova小组^[25]将基底表面进行聚赖氨酸修饰来固定细胞,在生理条件下细胞一般荷负电,而聚赖氨酸荷正电,因此可以利用聚赖氨酸与细胞之间的静电相互作用固定细胞。这种细胞固定方法操作简单且重复性好,是目前为止用得最多的一种方法。不过,由于聚赖氨酸与细胞壁存在一定相互作用,因而对细胞结构还是存在一定的影响。

最近Lu研究小组^[28]则使用琼脂糖凝胶来固定细胞,并进行了活细胞的原子力显微镜研究。琼脂糖凝胶层能较牢固地固定细胞,并能提供必要的营养物质以及一个相对湿的环境。与聚赖氨酸法相比,这种固定方法能更好地维持细胞的原始状态,不过操作相对要复杂一些。还有一些研究者将细胞固定于多孔聚合物膜中,利用聚合物膜上的微孔来固定细胞,

这种方法对细胞样品几乎没有任何损伤, 特别适合用于进行细胞活体、动态过程等方面的研究^[29-33].

此外, 有些研究人员应用原子力显微镜比较了固定的和活的细胞成像的差别^[34,35]. Ushiki 等人^[35]研究了活细胞在溶液状态下的成像, 发现能够观察到细胞膜下的细胞骨架结构, 并比较了固定细胞和活细胞的原子力显微镜图像差异, 为其他研究者开展这方面的研究工作提供了一定的参考.

3.2 细胞成像

自从20世纪90年代初期Butt等人^[18]首次将原子力显微镜应用到细胞成像方面以来, 陆续出现了很多关于细胞成像研究方面的报道. 有研究者直接用原子力显微镜来观察细胞表面的超微结构. Lister等人^[19]采用自然干燥固定样品的方法对耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)进行了MAC模式原子力显微镜成像研究(如图2), 得到了高分辨的细菌表面形貌图, 观察到了细菌表面压缩的六边形中间层(hexagonally packed intermediate, HPI).

有些研究者则利用原子力显微镜对细胞的一些生化生理过程进行了研究. Dufrêne等人^[29]利用原子力显微镜观察到了白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)表面微结构在发芽前后的变化. 发芽前孢子表面是规则的杆状物分布, 发芽后表面上则形成了一些不规则的颗粒状分布. 他们还对活的酵母细胞进行了高分辨的表面结构成像观察, 发现除了芽区之外, 水溶液中活的酵母细胞表面是均一平滑的^[30]. 而且他们还实时追踪了酶抽提过程中细胞壁结构的变

化, 发现随着时间的增加细胞表面的粗糙度也随之增加. Amro等人^[20]用原子力显微镜对大肠杆菌细胞外膜进行了高分辨成像, 并探讨了经生物化学处理后外膜结构及外膜渗透性的变化. Ohshiro小组^[36]则利用原子力显微镜对体外神经原与肥大细胞的通讯进行了研究. 此外, 还有一些小组将原子力显微镜用于细胞移动^[37]、胞吞作用^[38]、胞外分泌过程的质膜动力学^[39]、细胞凋亡^[40]等方面的研究.

另外, 随着原子力显微镜在细胞研究中的深入, 研究者们逐渐把可分析超微结构的原子力显微镜和其他分析技术结合起来, 对细胞的一些生物学过程进行了研究. 在1996年, 有研究者使用原子力显微镜成功地对核孔复合物(NPCs)进行了成像研究^[41]. 后来Oberleithner小组^[42-44]应用原子力显微镜和荧光显微镜等技术对NPCs结构与功能的关系进行了较全面的讨论, 他们研究了三磷酸腺苷、二价钙离子、pH值等对NPCs构型的影响, 并探讨了NPCs在调节矿物质皮质激素醛甾酮从细胞外进入细胞内的过程中的作用. 庞代文研究小组^[45]则利用原子力显微镜和荧光量子点等对纳米二氧化钛薄膜光催化细胞损伤机理进行了研究. 他们使用原子力显微镜追踪了大肠杆菌细胞壁细胞膜的损伤过程(如图3), 使用量子点等作为探针检测了细胞通透性的改变. 他们认为, 当细胞在二氧化钛薄膜存在的条件下受到近紫外光照时, 细胞壁首先降解, 接着细胞膜受到损伤, 细胞的通透性随之发生变化, 细胞内物质渗漏出来, 从而引起细胞死亡. 此外, 他们还和其他研究小组一

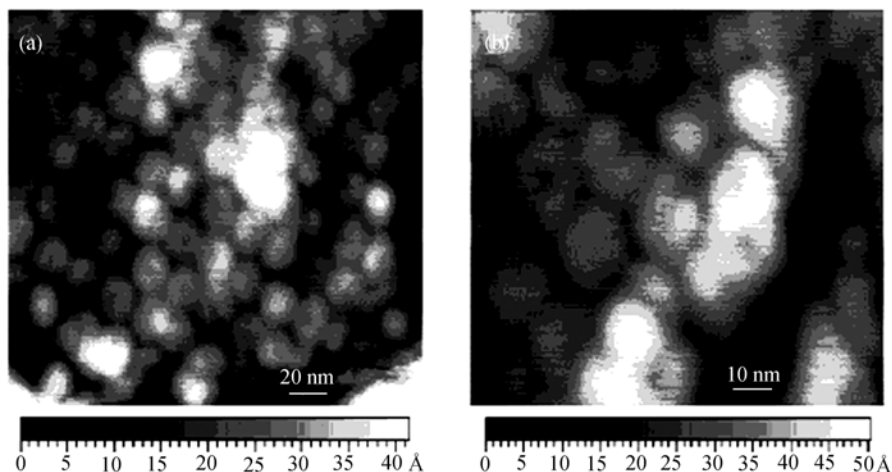


图2 细菌 HPI 层的两个高分辨的原子力显微镜图像

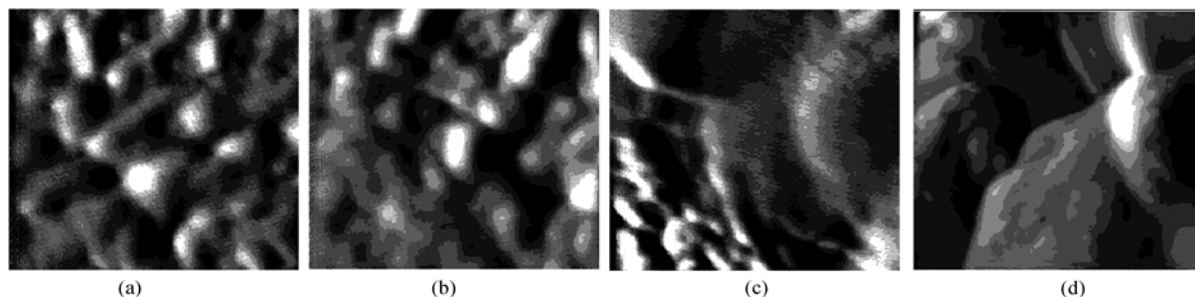


图3 随着光照时间增加细胞表面结构的原子力显微镜图像
(a)~(d)分别为 0, 5, 10, 60 min

起探讨了稀土金属离子 La^{3+} 对大肠杆菌的生物学影响^[46]. Quist等人^[47]则应用原子力显微镜、激光共聚焦免疫荧光成像等研究了间隙连接半通道的生理作用——依赖于胞外 Ca^{2+} 的等渗体积调控, 他们发现非间隙连接半通道可以随着胞外 Ca^{2+} 浓度的变化而调节细胞体积.

3.3 力检测

原子力显微镜还有一个重要的特点, 就是在扫描得到样品表面形貌的同时还可获得样品表面某一定点的力与距离的曲线关系, 并根据此曲线得到黏附力、键合力等数据以及样品的机械性质^[48,49]. 关于利用力与距离曲线关系进行力常数检测的报道很多. Dufrene小组^[29]在对静止和发芽孢子的表面结构和分子反应研究中发现, 力与距离的关系曲线显示孢子发芽过程中表面结构的变化与复杂的分子反应有关: 静止孢子与AFM原子力显微镜针尖之间没有黏附力, 而发芽孢子与针尖间则有很强的黏附力. 他们还结合原子力显微镜和力谱对上述孢子表面大分子拉伸情况进行了定量测定, 得到的结果与以前文献报道的单个右旋糖苷和直链淀粉多糖的弹性变形量一致^[32].

有些研究者还将针尖进行特殊的修饰, 进行黏附力的测定及成像研究. Ahimou等人^[50]将针尖进行了羧基修饰, 然后在纳米尺度上对酵母表面的静电性质进行了成像研究. Georgiou小组^[51]则使用原子力显微镜对细菌黏附行为进行了研究, 分析了影响细菌黏附力的因素, 并通过针尖修饰发展了一种检测细菌与生物材料之间作用力的方法. Grandbois研究组^[52]将针尖进行盖罩大蜗牛凝集素(HPL)的修饰并对组A和O的红血球细胞混合单层进行了黏附力成像(如图4). 他们发现HPL能特异性地与乙酰基半乳糖

胺末端化的糖脂结合, 并且只有组A红血球细胞才在其外膜表达这种糖脂. Ong等人^[53]则将大肠杆菌修饰到原子力显微镜针尖上, 并检测了它与不同憎水性表面的相互作用力, 发现憎水性相互作用在细胞黏附行为中起一定的作用.

除了对表面形貌以及表面力进行研究以外, 原

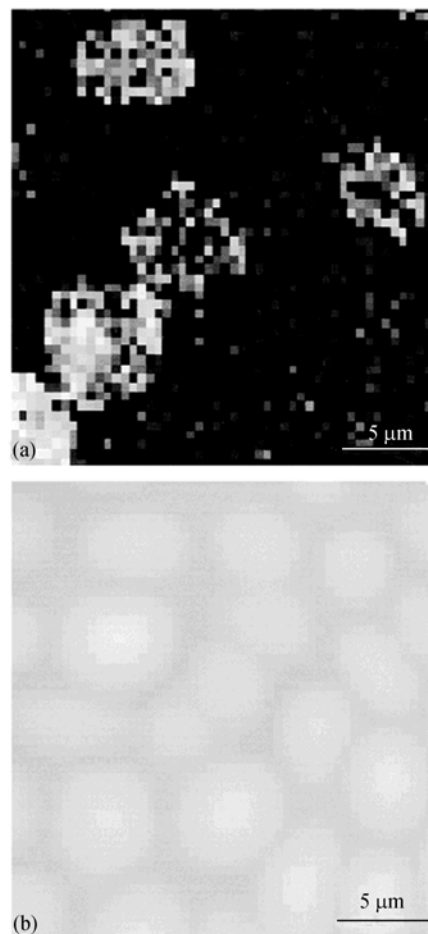


图4 红血球细胞混合单层的黏附力成像(a)和形貌成像(b)

子力显微镜还能用来研究样品表面的微观机械性质^[54-57]。Fang小组^[55]运用原子力显微镜对细菌表面弹性性质进行了研究。Gimzewski小组^[56]使用原子力显微镜对酵母细胞细胞壁的纳米机械运动进行了研究,揭开了酵母细胞生物学的一个新的方面——细胞壁动态纳米机械行为。Touhami等^[57]则利用原子力显微镜对酵母细胞表面的微观机械性质进行了研究。原子力显微镜的形貌成像和力成像表明细胞表面的弹性有着显著的区域性差异分布,在发芽区的黏弹力明显比别的区域要大。

3.4 细胞操纵

使用原子力显微镜进行细胞操纵方面的报道可以参照Ikai等人^[58]的综述文章。这里仅简单介绍一下使用原子力显微镜和全内反射荧光显微镜联用来进行单细胞的纳米操纵的方法。Ikai研究小组^[14]将全内反射显微镜和原子力显微镜组装在一起,利用原子力显微镜针尖将荧光探针注射入单个活细胞中,再通过荧光检测系统高灵敏的对荧光探针进行定位与追踪。通过使用这种联用技术,将原子力显微镜的精确定位机制与荧光显微镜的高灵敏分析结合起来,使得它将在细胞生物学研究中发挥更重要的作用。

4 展望

综上所述,在短短十几年间,原子力显微镜获得了广大研究者的青睐,并在细胞生物学领域得到了广泛的应用,然而,它也存在一些不足之处。原子力显微镜的分辨率受到探针针尖曲率半径的制约;针尖与样品的接触会污染针尖或对样品造成损害,并难以进行快速连续动态分析。为了适应细胞研究的需要,原子力显微镜应该在如下几个方面得到发展:(1)发展快速扫描的原子力显微镜以适应细胞生物学领域一些快速动态过程的观察;(2)发展具有分子识别能力的原子力显微镜以区分复杂体系中形貌类似的生物分子;(3)发展大范围扫描的原子力显微镜以适应一些细胞及组织器官等的成像研究;(4)发展新的细胞制样技术,简化操作并减小对细胞的损伤;(5)发展联用技术来拓展原子力显微镜应用范围。我们有理由相信,随着探针技术、制样方法以及联用技术等各方面的发展,原子力显微镜技术在生命科学领域必将发挥更重要的作用。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号:20305011)和国家杰出青年科学基金(批准号:20025311)资助项目。

参 考 文 献

- 1 白春礼,田芳,罗克. 扫描力显微术. 北京: 科学出版社, 2000. 7~32
- 2 Binnig G, Rohrer H, Gerber C, et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett*, 1982, 49: 57~61 [DOI]
- 3 Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930~936 [DOI]
- 4 鲍幸峰,方积年. 原子力显微镜在生物大分子结构研究中的应用进展. *分析化学*, 2000, 28: 1300~1307
- 5 Zhong Q, Innis D, Kjoller K, et al. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*, 1993, 290: L688~L692 [DOI]
- 6 Lindsay S M. Controlled force microscope for operation in liquids. US Patent, 5,515,719, May 14, 1996
- 7 Lindsay S M. Magnetic modulation of force sensor for AC detection in an atomic force microscope. US Patent, 5,513,518, May 7, 1996
- 8 Han W, Lindsay S M, Jing T W. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters*, 1996, 69: 4111~4114 [DOI]
- 9 Manalis S R, Cooper E B, Indermuhle P F, et al. Microvolume field-effect pH sensor for the scanning probe microscope. *Applied Physics Letters*, 2000, 76: 1072~1074 [DOI]
- 10 李晓军,何品刚,方禹之,等. 电化学原子力显微镜的应用. *分析化学*, 2004, 32: 395~401
- 11 Kelley S O, Barton J K, Jackson N M, et al. Orienting DNA helices on gold using applied electric fields. *Langmuir*, 1998, 14: 6781~6784 [DOI]
- 12 Boussaad S, Tao N J. Electron transfer and adsorption of myoglobin on self-assembled surfactant films: An electrochemical tapping-mode AFM study. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 4510~4515 [DOI]
- 13 Vesenlca J, Mosher C, Schaus S, et al. Combining optical and atomic force microscopy for life sciences research. *Biotechniques*, 1995, 19: 240~248
- 14 Nishida S, Funabashi Y, Ikai A. Combination of AFM with an objective-type total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM) for nanomanipulation of single cells. *Ultramicroscopy*, 2002, 91: 269~274 [DOI]
- 15 Joachimsthaler I, Heiderhof R, Balk I J. A universal scanning-probe-microscope based hybrid system. *Meas Sci Technol*, 2003, 14(1): 87~96 [DOI]
- 16 Schneider S W, Egan M E, Jena B P, et al. Continuous detection of extracellular ATP on living cells by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12180~12185 [DOI]
- 17 Stroth C, Wang H, Bash R, et al. Single-molecule recognition imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12503 ~ 12507 [DOI]
- 18 Butt H-J, Wolff E K, Gould S A C, et al. Imaging cells with atomic force microscope. *J Struct Biol*, 1990, 105: 54~61 [DOI]
- 19 Lister T E, Pinhero P J. In vivo atomic force microscopy of surface proteins on *Deinococcus radiodurans*. *Langmuir*, 2001, 17: 2624~2628
- 20 Amro N A, Kotra L P, Wadu-Mesthrige K, et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: Structural basis for permeability. *Langmuir*, 2000, 16: 2789~2796 [DOI]
- 21 Mendez-Vilas A, Gallardo A M, Perez-Giraldo C, et al. Surface

- morphological characterization of yeast cells by scanning force microscopy. *Surf Interface Anal*, 2001, 31: 1027~1030 [DOI]
- 22 Tollersrud T, Berge T, Andersen S R, et al. Imaging the surface of *Staphylococcus aureus* by atomic force microscopy. *APMIS*, 2001, 109: 541~545 [DOI]
- 23 Gad M, Awai K, Shimojima M, et al. Accumulation of plant galactolipid affects cell morphology of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286: 114~118 [DOI]
- 24 Norman R S, Frontera-Suau R, Morris P J. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 5096~5103 [DOI]
- 25 Bolshakova A V, Kiselyova O L, Filonov A S, et al. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy*, 2001, 86: 121~128 [DOI]
- 26 Crawford S A, Higgins M J, Mulvaney P, et al. Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. *J Phycol*, 2001, 37: 543~554 [DOI]
- 27 Camesano T A, Natan M J, Logan B E. Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir*, 2000, 16: 4563~4572 [DOI]
- 28 Micic M, Hu D, Suh Y D, et al. Correlated atomic force microscopy and fluorescence lifetime imaging of live bacterial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 34: 205~212 [DOI]
- 29 Dufre ne Y F, Bodnaert C J P, Gerin P A, et al. Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol*, 1999, 181: 5350~5354
- 30 Ahimou F, Touhami A, Dufre ne Y F. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. *Yeast*, 2003, 20: 25~30 [DOI]
- 31 Kasas S, Ikai A. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophys J*, 1995, 68: 1678~1680
- 32 van der Aa B C, Michel R M, Asther M, et al. Stretching cell surface macromolecules by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2001, 17: 3116~3119 [DOI]
- 33 van der Aa B C, Asther M, Dufre ne Y F. Surface properties of *Aspergillus oryzae* spores investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2002, 24: 277~284 [DOI]
- 34 Braet F, Rotsch C, Wisse E, et al. Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy. *Appl Phys A*, 1998, 66: S575~S578 [DOI]
- 35 T Ushiki, S Yamamoto, J Hitomi, et al. Atomic force microscopy of living cells. *Jpn J Appl Phys*, 2000, 39: 3761~3764 [DOI]
- 36 Ohshiro H, Suzuki R, Furuno T, et al. Atomic force microscopy to study direct neurite-mast cell (RBL) communication in vitro. *Immunology Letters*, 2000, 74: 211~214 [DOI]
- 37 Schneider S W, Pagel P, Rotsch C, et al. Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pfl gers Arch-Eur J Physiol*, 2000, 439: 297~303 [DOI]
- 38 Noguchi C K A, Furuno T, Nakanishi M. Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *FEBS Letters*, 1998, 421: 69~72 [DOI]
- 39 Schneider S W, Sriharan K C, Geibel J P, et al. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 316~321 [DOI]
- 40 Girasole M, Cricenti A, Generosi R, et al. Atomic force microscopy detects transient frictional contrasts in apoptotic cells induced by deprivation of interleukin-3. *Applied Physics Letters*, 2001, 78: 1143~1145 [DOI]
- 41 Terzic C P, Pyle J, Jaxoni M, et al. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca^{2+} stores. *Science*, 1996, 273: 1875~1877
- 42 Oanker T, Oberleithner H. Nuclear pore function viewed with atomic force microscopy. *Pfl gers Arch-Eur J Physiol*, 2000, 439: 671~681
- 43 Oberleithner H. Aldosterone and nuclear signaling in kidney. *Steroids*, 1999, 64: 42~50 [DOI]
- 44 Schafer C, Shahin V, Albermann L, et al. Aldosterone signaling pathway across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7154~7159 [DOI]
- 45 Lu Z X, Zhou L, Zhang Z L, et al. Cell damage induced by photocatalysis of TiO_2 thin films. *Langmuir*, 2003, 19: 8765~8768 [DOI]
- 46 Liu P, Liu Y, Lu Z X, et al. Study on biological effect of La^{3+} on *Escherichia coli* by atomic force microscopy. *J Inorg Biochem*, 2004, 98: 68~72 [DOI]
- 47 Quist A P, Rhee S K, Lin H, et al. Physiological role of gap-junctional hemichannels: Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol*, 2000, 148: 1063~1074 [DOI]
- 48 Green N H, Allen S, Davies M C, et al. Force sensing and mapping by atomic force microscopy. *TRAC-trends in analytical chemistry*, 2002, 21(1): 64~73
- 49 Takano H, Kenseth J R, Wong S-S, et al. Chemical and biochemical analysis using scanning force microscopy. *Chem Rev*, 1999, 99: 2845~2890 [DOI]
- 50 Ahimou F, Denis F A, Touhami A, et al. Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2002, 18: 9937~9941 [DOI]
- 51 Razatos A, Ong Y L, Sharma M M, et al. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 11059~11064 [DOI]
- 52 Grandbois M, Dettmann W, Benoit M, et al. Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48: 719~724
- 53 Ong Y-L, Razatos A, Georgiou G, et al. Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir*, 1999, 15: 2719~2725 [DOI]
- 54 Rotsch C, Jacobson K, Radmacher M. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 921~926 [DOI]
- 55 Fang H H P, Chan K-Y, Xu L-C. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *J Microbiol Meth*, 2000, 40: 89~97 [DOI]
- 56 Pelling A E, Sehati S, Gralla E B, et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2004, 305: 1147~1150 [DOI]
- 57 Touhami A, Nysten B, Dufre ne Y F. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir*, 2003, 19: 4539~4543 [DOI]
- 58 Ikai A, Afrin R. Toward mechanical manipulations of cell membranes and membrane proteins using an atomic force microscope—An invited review. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2003, 39: 257~277 [DOI]

(2004-12-24 收稿, 2005-01-25 收修改稿)