

原子力显微技术在细胞生物学中的应用

陈 勇 蔡继业* 吴扬哲

(暨南大学化学系, 广州 510632)

摘要 对近年来原子力显微技术(AFM)在细胞生物学中的应用大致归纳为几个方面进行了简单介绍, 还指出了细胞表面结构难于识别、细胞内部结构难以原位观察等 AFM 应用于细胞生物学中的难题, 并提出了“形状探针”的概念以及超薄切片的思路以解决这些难题。AFM 在细胞生物学中的应用研究还远远不足, 需要更多的科学工作者加入其中。

关键词 原子力显微技术; 细胞生物学; 形状探针

上个世纪 80 年代早期, 扫描探针显微技术首次获得硅表面的真实空间形貌, 引起了世界的关注。随后, 扫描探针显微技术的各种衍生技术得到长足的发展, 其中就包括已被广泛应用于物理、化学、生命科学等领域的原子力显微技术(atomic force microscopy, AFM)^[1]。目前, AFM 的研究对象已由无机扩展到有机, 从无生命到有生命。自发明伊始, 科学家们就立即意识到 AFM 是研究有机薄膜的一种理想工具, 随后, 这种技术在生物相关材料的研究中得到迅速应用^[2-4], 如氨基酸结晶物^[2]、纤维蛋白原、多聚丙胺酸、脂质-蛋白膜、膜蛋白噬菌调理素等。AFM 接下来的发展阶段就是观察完整的细胞^[5], 红细胞、淋巴细胞、大肠杆菌、盐杆菌等成为最初的研究对象。随着 AFM 技术的发展, 如液体或近生理条件下的可操作性、X-Y 和 Z- 方向扫描范围的扩大、力学和弹性等信息的可获得性等, AFM 在细胞生物学领域的应用将越来越广泛。

1 AFM 基本工作原理

AFM 是 Binning 等^[1]在扫描隧道显微术(STM)的基础上发展起来的, 一般由计算机、高分辨图像显示处理系统、电子控制系统和仪器探测系统等部分组成, 它需要精密机械、电子、计算机软硬件、图像处理技术等多学科知识。其核心部件是力的传感器件, 包括微悬臂(cantilever)和固定于其末端的针尖。AFM 采用压电陶瓷控制针尖在样品表面移动, 探针被固定在一根有弹性的悬臂末端, 悬臂长度为 100~200 μm , 厚度小于 1 μm , 弹性常数约为 0.1 N/m, 而金字塔状的氮化硅针尖位于悬臂的末端, 针尖顶端的半径为 2~10 nm。当对样品扫描

时, 针尖与水平放置的样品表面的距离可用压电陶瓷控制, 由于针尖原子与样品表面原子之间的范德华力, 若保持力的大小不变, 针尖将在垂直于样品表面方向起伏运动, 就会引起悬臂的偏转, 利用悬臂反射激光光点位移的方法, 从而使照射在悬臂末端激光束的反射光路发生变化, 经反射进入光电检测系统(PSPD), PSPD 将反射的激光束转化成电信号, 然后经过计算机处理, 就可得到样品表面的二维与三维形貌像及各种物理数据。AFM 通过探测针尖与样品间的微小作用力而得到样品的表面形貌图像及与样品表面各部位相关的重要数据, 如高度、宽度、粗糙度、截面曲线等, 并可同时获得其他诸如力学、弹性和黏度等样品表面结构的信息。

AFM 的成像模式主要有 3 种: 非接触模式(noncontact mode, NCM)、接触模式(contact mode, CM)和轻敲模式(Tapping Mode, TM)。由于 AFM 是用探针尖与样品间范德华力的大小来观察表面形貌的, 因此不受样品是否导电的限制, 补偿了 STM 只能测量导体、半导体, 而不能检测绝缘体的缺陷。

2 AFM 在细胞生物学领域的应用

2.1 大量细胞的定量分析

在细胞培养过程中, 人们通常要用光学显微镜对细胞进行计数, 以观察其生长情况, 然而这种观

收稿日期: 2003-09-27 接受日期: 2004-06-01

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.2001CB510101);
国家自然科学基金项目(No.60278014); 国家自然科学基金重点项目(No.0230350)

* 通讯作者。Tel: 020-85223569, Fax: 020-85223569, E-mail: tjycal@jnu.edu.cn

察是非常粗糙的, 无法得到细胞平均体积、平均表面积及不同体积和表面积细胞的分布等参数。在疾病的临床检验中, 通常要先对病人血液涂片中的血细胞进行形态和数量的观察, 这种观察也掺杂着观察者的主观判断, 而且, 涂片过程中对红细胞的形态也可能造成很大改变, 所以也不太精确。而 AFM 能够获取单个细胞的体积、表面积、体积/表面积比以及大量细胞的平均值等参数, 所以使得 AFM 在前面所述领域中有用武之地。如 O'Reilly 等^[6]应用 AFM 对几个 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ 扫描区域中的 100 个红细胞进行了定量分析, 他们获取了不同细胞的厚度、宽度、表面积和体积等参数, 并比较了固定在基片上时的平均细胞体积与悬浮状态时的平均细胞体积两参数之间的关系。AFM 在大量细胞的定量分析上的应用研究有望促进其在临床病理学诊断中的应用, 这应该是其今后发展的一个方向。

2.2 细胞整体、局部和微观结构外部形貌及因各种原因导致的细胞整体或超微结构形态变化的动态观察

最初, 人们应用 AFM 仅仅观察了单个细胞的外部形貌, 并将其与传统光学显微镜、电子显微镜、荧光显微镜和共聚焦显微镜等技术的观察结果进行比较。目前已应用 AFM 获得了多种正常细胞和肿瘤细胞的外部形貌图像, 如红细胞、淋巴细胞、血小板、巨噬细胞、神经细胞、神经胶质细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、造骨细胞、精子细胞、皮肤纤维原细胞、肥大细胞、耳蜗绒毛细细胞、口腔细胞等, 以及腺癌细胞、L929 细胞、RBL-2H3 细胞、F9 细胞、MDCK 细胞、牙骨质肿瘤细胞等肿瘤细胞^[1]。随着 AFM 技术的普及、各领域研究人员的参与、AFM 水平和垂直扫描范围的扩大, 越来越多种类的细胞将得到观察。在 AFM 对细胞的研究中, 研究者们总是希望用 AFM 直接观察细胞的表面结构, 然而, 这却存在细胞表面结构难于识别的问题, 对于表面结构非常复杂的细胞(如神经细胞等)更是如此, 如果能找到某些大小和形状特异的已知分子直接或间接地特异性地结合到欲研究的膜蛋白或膜脂上, 识别这些分子, 进一步用 AFM 进行高分辨的观察。这不仅能够直观地研究细胞膜上的单个生物大分子结构, 还能够研究这些分子在细胞膜上的分布, 结合几种“形状探针”, 还可以研究不同分子间可能的相互作用及它们的功能, 这种方法应该比荧光探针间接地研究被标记物的方法具有更大的优势。“形状探针”应具有的特征: (1) 大小和形状特异。特别是对通过多种形状探针研究不同分子间相互作用时更是如此; (2) 其分

子量足够大, 能够在细胞膜上被 AFM 详细观察, 但又不能太大, 因为太大可能会覆盖多个目标分子; (3) 能够直接或间接地(如通过其他抗体, 凝集素等特异结合)特异性地结合到目标分子上。假如能够找到这样一些“形状探针”, 必将大大促进 AFM 在细胞生物学中的应用。

随着液体池技术的发明和完善, 使得人们在液体或近生理条件下观察活细胞形态及其随时间变化的动态过程成为可能, 可以研究细胞伪足的运动、细胞的铺展、突触的生长、细胞颗粒的分泌、内吞、外吐及胞内小包运输等。例如, Rotsch 等^[7]利用 AFM 观察了大鼠肺癌 MTLn3 细胞在加入表皮生长因子后细胞伪足运动情况。Nakanishi 等^[8]在利用 AFM 和共聚焦显微技术研究基因转染时观察到了靶细胞对脂质体与 DNA 复合物的内吞作用; Almofti 等^[9]也研究了细胞对脂质体与 DNA 复合物的内吞作用。此外, Dvorak^[10]利用 AFM 观察到了脊椎动物活细胞有丝分裂的全过程, 发现在有丝分裂后期纺锤区的硬度发生了短暂但显著的减弱; 并对用 *Toxoplasma gondii* 感染的脊椎动物细胞进行了研究。Kuznetsov 等^[11]对鼠造骨细胞、小鸡胚胎成纤维细胞做了研究, 观察到了它们的运动、细胞分裂和聚集、病毒引起的变形以及凋亡等。Braet 等^[12]对活癌细胞、成纤维细胞和巨噬细胞的超微结构进行了研究。随着液体池技术的成熟, 我们还可以在接近生理条件下对细胞进行操作, 如在细胞表面打孔, 切割等。Danker 等^[13]结合 AFM 和苜蓿片钳(patch-clamp)技术对拾取的核膜进行了操作; Nishida 等^[14]结合 AFM 和 TIRFM(total internal reflection fluorescence microscope)对单个细胞进行了纳米操作, 他们首先采用化学法将荧光珠固定在 ZnO 须状晶体上, 再将其黏合到 AFM 针尖上, 而后将 AFM 针尖连同修饰物刺入活 BALB/3T3 细胞中, 随后观察到了细胞中的荧光珠。这一技术对细胞内分子标记、细胞中生物大分子的运动和功能的探测及研究等方面具有很大的应用价值。

通常在应用 AFM 观察细胞样品时, 都会对细胞的局部(几微米扫描范围)和超微结构(一微米以下扫描范围)进行观察。此外, 还有一些对某些细胞的特化结构(如鞭毛、突触、微绒毛等)进行观察的报道。如 Allen 等^[15]应用 AFM 清晰地观察到小牛精子细胞头和尾局部区域的纳米尺寸的亚细胞结构

自 AFM 技术发明以后, 很快就吸引了药理学、毒理学、生物医学、光学和化学等领域科学家们的注意, 并进行了各种药物、试剂、病毒或细菌、射线或激光等作用引起的细胞形态变化和膜

表面超微结构等变化的研究。Bushell 等^[16]观察了细胞松弛素作用下成纤维细胞的形态随作用时间延长的动态变化过程。Lehto 等^[17]观察到了 HeLa 细胞提取物中单个肌动蛋白纤维的生长、收缩、分叉以及与其内涵体(endosome)的相互作用和肌动蛋白所形成的三种类型的网状连接即 X、Y- 或 Y- 型。Nakamura 等人^[18]观察了大鼠嗜碱性白血病 RBL-2H3 细胞在加入某种抗原(1.0 $\mu\text{g/ml}$ TNP17-OVA)或 IgG1 免疫复合物(3.0 $\mu\text{g/ml}$ anti-TNP IgG1)后的形态变化。Walch 等^[19]用 AFM 研究了链球菌溶血素 O(streptolysin O, SLO)对人血小板的形态和微弹性的影响。他们发现,随着 SLO 的加入及作用时间的延长,血小板的形态和弹性都发生较大的变化,弹性逐渐增大,而起肌动蛋白骨架系统稳定作用的毒伞素(phalloidin)可部分恢复 SLO 对细胞的弹性影响,说明 SLO 引起的细胞稳定性的丧失可能是与质膜或细胞骨架有关。Schneider 等^[20]应用 AFM 获取了来源于小牛主动脉的内皮细胞的形貌图,同时测量了醛固酮(aldoosterone)作用后细胞体积的变化。他们发现,醛固酮处理 5 min 后细胞体积增大了 28%, 25 min 后细胞体积恢复到正常水平,并且不再随着作用时间的延长而发生改变,质膜 Na^+/H^+ 载体阻断剂——氨氯吡啶(amiloride)则可以抑制醛固酮诱导的细胞体积的这种变化。Bonfiglio 等^[21]应用 AFM 研究了人神经母细胞瘤细胞的分化,观察到视黄酸(retinoic acid)诱导的轴突样结构的生长过程,发现在 2 h 内视黄酸就导致了细胞膜和细胞骨架形态的显著变化。Cheng 等^[22]观察了 Gd^{3+} 诱导的人红细胞膜超微结构的形态变化。他们发现,在低浓度时($1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 处理 30 min),会使红细胞膜表面产生区域结构(domain structure),而在高浓度时($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$),则会诱导产生火山口样的孔洞结构(crater-shaped pores),而 $[\text{Gd}(\text{Cit})_2]^{3-}$ (Gd^{3+} 的阴离子复合物)在这个浓度时只能诱导红细胞产生区域结构,用 EDTA 冲洗 Gd^{3+} 处理的红细胞后,只能消除孔洞结构,而区域结构还保留着。他们认为,这些结构的产生很可能加强了细胞膜的通透性。

2.3 细胞膜表面分子和通道等的观察

目前,已经有 50 多万种蛋白质被测序,而仅有 5 千多种蛋白质的空间结构被原子分辨测定,其中,只有 10 来种是膜蛋白。用来确定蛋白质三维空间结构的技术主要是 X 光晶体衍射、EM 和 AFM 等,由于 AFM 的无损性,越来越多的科学家开始把注意力投向 AFM 上,期望能够应用 AFM 来测定膜蛋白的空间结构,并得到预想不到的结果。用 AFM 确定的经典膜蛋白是菌视紫质(bacteriorhodopsin)^[23]和大

肠杆菌外膜蛋白 OmpF^[24]。随后, Müller 等^[25]又研究了在不同条件下(如电压和酸碱度等)这两种膜蛋白的形态变化。大部分膜表面分子或通道的 AFM 研究均是观察细胞膜外部分,而 Ehrenhöfer 等^[26]则设计了一种新方法,应用 AFM 去观察 MDCK 细胞膜的内膜部分,以检测 ATP- 敏感的蛋白质聚集体。然而,由于前面所提到的细胞表面结构的难以识别问题,这方面的研究工作进展较慢,还有待于 AFM 技术的进一步发展。令人鼓舞的是,去年法国居里研究所的 Scheuring 等^[27]首次利用 AFM 观察到了两个膜蛋白的结合,他们在对红假单胞菌属绿膜(*Rhodopseudomonas viridis* membranes)的光合作用中心体的研究中,发现每个光合作用反应中心均被由 16 个光收集(light-harvesting, LH1)亚体形成的闭合圆环所包围,反应中心本身不对称,但与 LH1 结合紧密。

2.4 细胞骨架的观察

广义的细胞骨架系统包括细胞外基质、细胞膜骨架、细胞质骨架和细胞核骨架系统。对于细胞外基质的 AFM 研究,主要是通过两种方法,即直接观察细胞外基质分子的聚集或相互作用,以及观察其与细胞的相互作用。对于细胞外基质与细胞的相互作用,通常是使用针尖修饰的办法(将胶原蛋白^[28]、纤维黏连蛋白^[29]和层黏连蛋白等连接到针尖或微球上),再通过力学、弹性和黏性等信息的获取来进行分析。对于细胞膜和细胞质骨架系统,最初是通过分离骨架蛋白膜(如红细胞血影膜或其外翻膜的制备等)来进行 AFM 扫描观察,但在膜的制备过程中往往会损坏膜骨架系统,所以人们尝试寻找其他的方法进行观察。由于细胞质膜非常柔软,当用曲率半径为 10~50 nm 的针尖以 0.1~10 nN 数量级的作用力以接触模式扫描细胞表面时,针尖通常会压迫或穿透细胞膜,从而可观察到细胞内部的较硬的结构,如细胞骨架结构,这时,就可以通过在细胞膜外表面扫描的方法直接观察到细胞内部的骨架系统,而不需要对细胞进行特殊处理。Takeuchi 等^[30]应用 AFM 直接在红细胞膜外表面扫描及对制备的血影膜中细胞质表面上的膜骨架系统进行观察,他们发现,通过这两种方法得到的红细胞膜骨架系统中血影蛋白(spectrin)网络的平均网孔尺寸分别为 4800 nm² 和 3000 nm²,说明血影蛋白形成了三维折叠的网筛结构,而且,直接在细胞外表面扫描的方法可观察到 80% 的血影蛋白。Christian 等^[31]使用轻敲模式 AFM 扫描了培养的 CV-1 肾细胞膜表面,也观察到了细胞的骨架结构。Chang 等^[32]应用 AFM 在未使用任何染色技术的情况下观察了活细胞中的肌动蛋

白纤维和其他细胞骨架结构。Wada 等^[33]利用 AFM 观察到了豚鼠外部绒毛细胞(outer hair cells, OHCs)的皮质骨架在经过胼处理后的形态学变化。值得一提的是, Ziegler 等^[34]使用一种喷射松解的方法(lysis-squirting protocol), 使细胞外表面贴附于基片上, 而细胞质侧的细胞膜表面则暴露于空气中, 从而可被 AFM 观察。根据这种方法, 他们原位观察到细胞膜表面下的肌动蛋白纤维, 以及不同盐浓度对这些骨架纤维的影响。

2.5 离体或原位的细胞内结构(如染色体、线粒体、叶绿体等细胞器等结构)的观察

由于 AFM 主要还是一种样品表面扫描工具, 所以, 目前对细胞内部结构的观察, 主要是通过分离、提取后进行扫描的方法来进行。然而, 分离、提纯后, 细胞内部结构的形态和功能都发生了很大变化, 而且, 研究结果的可靠性也受分离、纯化时的条件(如温度、酸碱度、离体时间、其他生化试剂的作用以及离心和冷冻等物理作用等)的影响, 所以, 在细胞生物学研究中, 人们尽量采取原位观察的研究手段, 如各种光学显微镜和 TEM 等。TEM 中超薄切片技术的完善, 使我们想到, 也许这种技术可以为 AFM 的细胞内部结构原位观察提供方便之门, 目前已有一些研究者想到并做了这方面的初步尝试, 如 Melling 等^[35]应用 AFM 扫描了人三叉神经节半薄切片样品, 观察到三叉神经节细胞的细胞膜、细胞核、核膜、核仁、脂褐质颗粒(lipofuscin granules)等细胞内部结构, 及三叉神经细胞周围的外套细胞(mantle cells)等结构。Titcombe 等^[36]应用 AFM 扫描了绒毛纤维(merino wool fibres)的切片, 观察到正和副皮质细胞(ortho- and paracortical cells)、细胞膜复合物(cell membrane complex)、巨纤维(macrofibrils)、细胞核物质等细胞内部结构。此外, Melling 等^[37]应用 AFM 对健康人的眼球运动神经的超薄切片做了研究, 观察到了具有环状结构的有髓神经纤维。对细胞内部结构的原位观察是细胞生物学的需要, 如果能够实现这个目的, 必将进一步扩展 AFM 在细胞生物学中的应用。

2.6 细胞膜表面力学、弹性、黏度等信息的获取

无论是对分子还是细胞, 目前国际上 AFM 应用研究中最热门的方向之一就是力学、弹性、黏度等信息的获取。这些信息的获取主要通过非修饰的和修饰的 AFM 探针两种方式来实现。化学和生物化学修饰的 AFM 探针的发展大大地促进了 AFM 的应用范围。目前, 已经有多种方法对 AFM 探针进行修

饰。最简单的针尖处理方法, 就是对整个针尖表面进行完全的氧化, 使其末端完全覆盖 Si-OH 功能基团, 但由于相对较高的表面自由能, 这个表面也容易黏附污染物。目前, 最常使用的针尖修饰方法, 是将烷基硫醇(alkylthiol)分子固定到金包裹的 AFM 探针上^[38]。这种方法具有制备简单、广泛的可能的功能基团、较稳定、能被传统的表面分析方法很好地鉴定等优点。但也具有一些缺点, 比如, 在某些环境条件下烷基硫醇单层的相对不稳定以及敷金属(metallization)等原因, 会导致探针形貌的劣化, 这将限制巯基修饰的 AFM 金探针在非氧化条件以及低于 60 °C 的温度等条件下的应用。有些实验室则采用硅烷(alkylsilane)直接去修饰硅(silicon)或硅酸盐(silicate)AFM 探针^[39]。这种方法对于机械和化学应力更稳定, 而且不需要应用敷金属法, 缺点是, 这样形成的单层膜有更多的缺陷以及不够规整。Hafner 等^[40]发展了一种碳纳米管(carbon nanotube, CNT)AFM 探针, 他们通过氧化的末端 C 原子间的化学反应对 CNT 针尖进行了修饰, 甚至能够将单个生物分子连接到 CNT-AFM 探针末端。还有一种探针修饰方法, 就是将微米尺寸的二氧化硅小球、磁珠、玻璃珠、甚至单个细胞固定到 AFM 悬臂的末端, 其优点是, 更大的针尖半径允许更多的分子间相互作用, 从而使得微小作用力的强化, 可被用于对微米尺度表面的测量。其他的, 如腐殖酸(humic acid)^[41]、电化学修饰^[42]、聚乙烯氯化物(polyvinyl chloride)^[43]等修饰的 AFM 探针也被研究。例如, 聚乙烯氯化物修饰的 AFM 探针是一种离子选择性工具, 能够对样品表面选定区域内的某种离子浓度进行定量分析, Schar-Zammaratti 等^[44]将这种修饰的针尖用于研究活细胞的离子通道及高钾离子流动。许多修饰针尖的应用研究都把注意力集中在细胞之间^[45]或细胞与细胞外基质之间^[46]的相互作用的检测上, 因为这些相互作用与免疫学和组织工程等有紧密联系。如 Lehenkari 等^[47]用与哺乳动物组织细胞外基质成分相似的多肽序列来修饰 AFM 探针, 来测量其与多种细胞膜表面之间的相互作用力。还有多个实验室采用特异性修饰的 AFM 探针来观察细胞的表面。如 Grandbois 等^[48]使用蛋白质修饰的 AFM 探针来获取红细胞单层的黏性图像, 并可根据不同细胞的黏性差异进行细胞鉴定。

目前, 许多研究均同时获取外部形貌与力学、弹性、黏性等信息的静态或动态过程来进行分析, 如前文所述 Walch 等人对血小板的观察, Kawabata 等^[49]对成纤维细胞的观察, 此外, Wada 等^[50]对 OHC(outer hair cell)的局部硬度做了研究, 并分析了

与其超微结构的关系。而对更复杂的生物学过程的研究,如细胞连接、信号转导、细胞内外离子浓度的改变和细胞周期等过程,更是需要结合这些信息的获取来进行分析。然而,目前AFM还处于其发展的初级阶段(从发明至今还不到20年时间),其在细胞生物学中的应用研究还远远不足,需要更多的科研工作者做大量的工作,以促进AFM技术的发展和运用。

参考文献 (References)

- [1] Binnig G *et al.* *Phys Rev Lett* 1986, **56**: 930
- [2] Gould S *et al.* *Nature*, 1988, **332**: 332
- [3] Drake B *et al.* *Science*, 1989, **243**: 1586
- [4] Butt HJ *et al.* *Biophys J* 1990, **58**: 1473
- [5] Butt HJ *et al.* *J Struct Biol* 1990, **105**: 54
- [6] O'Reilly M *et al.* *Ultramicroscopy*, 2001, **86**: 107
- [7] Rotsch C *et al.* *Ultramicroscopy*, 2001, **86**: 97
- [8] Nakanishi M *et al.* *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **52**: 197
- [9] Almofti MR *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**: 246
- [10] Dvorak JA. *Methods*, 2003, **29**: 86
- [11] Kuznetsov YG *et al.* *J Struct Biol*, 1997, **120**: 180
- [12] Braet F *et al.* *J. Microsc.*, 1998, **190**: 328
- [13] Danker T *et al.* *Cell Biol Int*, 1997, **21**: 747
- [14] Nishida S *et al.* *Ultramicroscopy*, 2002, **91**: 269
- [15] Allen MJ, *et al.* *J Struct Biol* 1995, **114**: 197
- [16] Bushell GR *et al.* *Appl Surf Sci*, 1999, **144-145**: 141
- [17] Lehto T *et al.* *FEBS Lett*, 2003, **551**: 25
- [18] Nakamura R *et al.* *Immunol Lett*, 2000, **72**: 167
- [19] Walch M *et al.* *Ultramicroscopy*, 2000, **82**: 259
- [20] Schneider SW *et al.* *Cell Biol Int*, 1997, **21**: 759
- [21] Bonfiglio A *et al.* *Exp Cell Res*, 1995, **216**: 73
- [22] Cheng Y *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1421**: 249
- [23] Müller DJ *et al.* *J Mol Biol*, 1995, **249**: 239
- [24] Schabert FA *et al.* *Science*, 1995, **268**: 92
- [25] Müller DJ *et al.* *J Mol Biol*, 1999, **285**: 1347
- [26] Ehrenhöfer U *et al.* *Cell Biol Int*, 1997, **21**: 737
- [27] Scheuring S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 1690
- [28] Kim H *et al.* *Appl Surf Sci*, 2002, **188**: 493
- [29] Kim H *et al.* *Colloids Surf B*, 2002, **25**: 33
- [30] Takeuchi M *et al.* *Biophys J*, 1998, **74**: 2171
- [31] Grimellec CL *et al.* *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie/Life Sci*, 1997, **320**: 637
- [32] Chang L *et al.* *Biophys J*, 1993, **64**: 1282
- [33] Wada H *et al.* *Hear Res*, 2004, **187**: 51
- [34] Ziegler U *et al.* *FEBS Lett*, 1998, **436**: 179
- [35] Melling M *et al.* *NeuroImage*, 2001, **14**: 1348
- [36] Titcombe LA *et al.* *Micron*, 1997, **28**: 69
- [37] Melling M *et al.* *NeuroImage*, 2003, **20**: 795
- [38] Green JBD *et al.* *J Phys Chem*, 1995, **99**: 10960
- [39] Wenzler LA *et al.* *Langmuir*, 1997, **13**: 3761
- [40] Hafner JH *et al.* *J Phys Chem B*, 2001, **105**: 743
- [41] Plaschke M *et al.* *Surf Interface Anal*, 2000, **30**: 297
- [42] Díaz DJ *et al.* *Langmuir*, 2001, **17**: 5932
- [43] Zammaretti P *et al.* *Anal Chem*, 2000, **72**: 3689
- [44] Schar-Zammaretti P *et al.* *Anal Chem*, 2002, **74**: 4269
- [45] Benoit M *et al.* *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 313
- [46] Baumgartner W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 4005
- [47] Lehenkari PP *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **259**: 645
- [48] Grandbois M *et al.* *J Histochem Cytochem*, 2000, **48**: 719
- [49] Kawabata K *et al.* *Curr Appl Phys*, 2001, **1**: 66
- [50] Wada H *et al.* *Hear Res*, 2003, **177**: 61

Application of Atomic Force Microscopy in Cell Biology

Yong Chen, Ji-Ye Cai*, Yang-Zhe Wu

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract The applications of atomic force microscopy in cell biology have been introduced simply in the paper. Several problems, such as recognition of surface structures of cell and observation *in situ* of inner structure of cell, were discussed; what's more, "shape probe" and superthin section were put forward to solve the problems. At present, AFM has not been used widely in cell biology. It urges the necessity for studies of more researchers.

Key words atomic force microscopy; cell biology; shape probe

Received: September 27, 2003 Accepted: June 1, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2001CB510101), the National Natural Science Foundation of China (No.62078014), and the Key Program of National Natural Science Foundation of China (No.30230350)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85223569, Fax: 86-20-85223569, E-mail: tjycail@jnu.edu.cn