

显微技术发展及其在生物学中的应用综述

冯权江¹, 龙文静², 黄绍书²

¹六盘水市第十九中学, 贵州 六盘水

²六盘水市第二十三中学, 贵州 六盘水

收稿日期: 2024年5月31日; 录用日期: 2024年7月12日; 发布日期: 2024年7月22日

摘要

简要概述显微技术的发展。着重介绍两类扫描探针显微镜即扫描隧道显微镜(STM)和原子力显微镜(AFM)在生物科学研究中的应用, 具体指STM在对核酸、蛋白质、生物膜研究中的应用和AFM在生物分子领域、细胞器和细胞表面领域、微生物领域及纳米材料领域等方面研究中的应用。

关键词

光学显微镜, 纳米结构可视化, 扫描隧道显微镜, 原子力显微镜, 生物学

A Review of the Development of Microscopic Technology and Its Applications in Biological Sciences

Quanjiang Feng¹, Wenjing Long², Shaoshu Huang²

¹No. 19 Middle School in Liupanshui City, Liupanshui Guizhou

²No. 23 Middle School in Liupanshui City, Liupanshui Guizhou

Received: May 31st, 2024; accepted: Jul. 12th, 2024; published: Jul. 22nd, 2024

Abstract

This paper provides a brief overview of the development of microscopy technology. Emphasis is placed on the application of two types of scanning probe microscopes, namely scanning tunneling microscopy (STM) and atomic force microscopy (AFM), in biological science research. Specifically, STM's application in the study of nucleic acids, proteins, and biofilms, as well as AFM's application in the fields of biomolecules, organelles and cell surfaces, microorganisms, and nanomaterials, are introduced.

Keywords

Optical Microscope, Visualization of Nanostructures, Scanning Tunneling Microscope, Atomic Force Microscope, Biological Science

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 显微技术的发展概况

16 世纪末期的 1590 年前后, 荷兰眼镜商亚斯·詹森和荷兰发明家汉斯·利珀希分别各自独立地用两片透镜发明制作了最早的简易显微镜[1]。但他们并没有用这一简易的显微镜做过任何重要的观察, 因此当时并没有引起人们的重视。

1665~1675 年期间, 荷兰物理学家列文虎克制成并改进了能将物体放大 300 倍的实用型显微镜[2], 并用之发现了红血球和酵母菌。至此, 科学研究翘首进入了微生物世界。显微镜的发明和列文虎克的研究工作, 为生物学的发展奠定了基础。

相衬显微镜的发明, 掀起了活细胞的研究热潮。随着科学进步和技术发展, 各种荧光显微镜陆续被发明, 用于进一步揭示细胞的内部结构和细胞器之间的相互作用及相关的生理过程。然而, 由于光学衍射极限的存在, 传统光学显微镜的横向空间分辨率被限制在约 200 nm, 虽然这个水平的分辨率已经解决了许多生物和医学问题, 但仍然有非常多的亚细胞器结构和细胞的动态过程在这个水平上无法被清晰观察到[3] [4]。在这样的形势之下, 众多突破光学衍射极限的超分辨显微成像技术已经发展得越来越成熟, 甚至已经有许多超分辨成像技术开始商业化, 例如受激发射损耗显微术(STED)、随机光学重构显微术(STORM)和结构光照明显微术(SIM)等。光学超分辨显微成像技术克服了衍射极限带来的挑战, 使研究纳米结构可视化成为可能[5]。

1926 年, 德国物理学家汉斯·布什研制了第一个磁力电子透镜, 这是电子显微镜的基础。1931 年, 德国柏林理工大学的年轻研究员厄恩斯特·卢斯卡成功地实现了在阳极光圈上放置金属网格的电子放大图像, 研制了第一台透射电子显微镜(TEM) [6], 在其中首次使用了两个磁透镜。卢斯卡最初的电子显微镜只有 17 倍的放大倍数, 自此至 1933 期间, 卢斯卡致力改进提高电子显微镜的放大率, 使电子显微镜达到 1200 倍的放大倍数。

卢斯卡的电子显微镜问世之后不太长的时间, 德国西门子公司建立超显微镜学实验室, 致力于改进 TEM 的成像效果, 研制的第一台商业穿透式电子显微镜在 1939 年上市。1938 年, 世界上第一台扫描电子显微镜(SEM)由 Von Ardenne 研制成功, 在 1965 年, 第一台商业 SEM 研制成功, 很快成为细胞生物学的研究工具; 1952 年, 英国工程师 Charles Oatley 也制造出了一台扫描电子显微镜(SEM)。后来又出现了扫描透射电子显微镜(STEM), 这种显微镜兼备有透射电子显微镜和扫描电子显微镜的功能。20 世纪 60 年代, 透射电子显微镜的加速电压越来越高, 可以透视的物质也越来越厚[7]。这个时期电子显微镜达到了可以分辨原子的能力; 20 世纪 80 年代人们能够使用扫描电子显微镜观察湿样本。

时间进入到 20 世纪 80 年代初期, 一种机械式地用探针在样本上扫描移动以探测样本影像的显微镜即扫描探针显微镜逐渐诞生了, 这种显微镜包括扫描隧道显微镜(STM) [8]和原子力显微镜(AFM) [7]两个分支。其中, 扫描隧道显微镜(STM)分为电子扫描隧道显微镜(SEM)和光子扫描隧道显微镜(PSTM); 原子力显

显微镜又包括普通原子力显微镜(AFM)和快速原子力显微镜(HS-AFM)。

1983年,国际商业机器公司(IBM)苏黎世实验室的两位科学家 Gerd Binnig 和 Heinrich Rohrer 发明了第一台扫描隧道显微镜;1985年,IBM公司的 Gerd Binnig 和 Stanford 大学的 Calvin Quate 共同研发了第一台原子力显微镜。至此,人们不仅能够看到金属表面,还能看到非金属表面,弥补了 STM 的不足。

现在的光学显微镜跟 19 世纪时期的相比,并没有什么大的改进。但是电子显微镜一直在不断向前发展,现在通过电子显微镜可以得到放大 1000 多万倍的影像,不仅可以看到病毒,而且可以看到大分子,甚至可以看到原子。

随着显微技术的不断提高,显微镜越来越精致,人们观察到的生物体结构越加精细:1939年,科学家能看到的已不只是细胞,而是细胞内部的结构;1965年,美国加利福尼亚大学用一个三维电子显微镜将神经细胞放大了 20,000 倍;今天的电子显微镜能将物体放大 1000 万倍以上。

2. 生物科学进展与显微技术

光学显微镜的诞生起就将生物科学真正领入生物世界,可以看到细胞;电子显微镜的诞生又逐渐将生物科学领入分子生物学时代。

2.1. 扫描隧道显微镜

自从 1953 年建立 DNA 双螺旋结构模型,从而开创分子生物学以来,人们就一直梦想能看到 DNA 的庐山真面目,但直到扫描隧道显微镜(STM)的发明之后,于上个世纪 90 年代初期得以圆梦。STM 在生物科学不仅揭示了 DNA 等生物大分子直观的精细结构图像,而且还显示了它在纳米生物学(nanobiology)研究中的巨大潜力。

2.1.1. 核酸的研究

核酸研究的主要内容包括证实已有的核酸模型和探索新的核酸模型两个方面,在证实已知模型方面有较大进展,在发现新模型方面也有一定成效。

1989 年初,美国劳伦斯利弗莫尔-劳伦斯伯克利联合小组发表了世界上第一张在大气环境下的清晰 DNA 分子的 STM 图像[9]。美国明尼苏大学和中国科学院上海原子核研究所、上海细胞研究所联合小组分别得到了左旋 DNA 图像;此后,美国新墨西哥大学观察到单链 DNA 的碱基[10]。

1989 年底中国科学院上海原子核研究所、上海细胞研究所与俄罗斯(前苏联)科学院分子生物研究所合作,在世界上首次观察到平行双螺旋 DNA 的 STM 图像,这是一种不同于通常的反平行双螺旋 DNA 的新的核酸结构,是分子遗传领域的一项重大发现。

1990 年初,美国加州理工大学研究者在超高真空条件下观测到双螺旋 DNA 的碱基对[11]。

不言而喻,这些进展和发现不仅证实了依据 X 光晶体衍射以及透射成像等方法建立的 DNA 模型,而且还显示出 STM 用于 DNA 顺序分析和进一步探索核酸型模型的应用前景。

2.1.2. 蛋白质的研究

过去测定蛋白质分子结构,通常是用生化方法提纯蛋白质分子,待结晶后用 X 光晶体衍射结合遗传学、生物化学方法,经过大量实验与繁杂的计算推论,建立蛋白质结构。

应用 STM 研究蛋白质,首先就是观察蛋白质分子的表面结构形貌。取少量的蛋白质样品,不需经过结晶过程,通过调节制样条件,即可观察蛋白质分子不同侧面的形貌。再参考生物化学实验的结论,即可建立蛋白质结构。

这方面的研究已日趋成熟。早在上个世纪 80 年代后期,中国科学院化学研究所 STM 小组报道了有

关胰岛素的研究工作；美国明尼苏大学的一个研究小组在大气和溶液环境下分别观察到了磷酶化激酶的面貌。另外，应用 STM 观察蛋白质与 DNA 的复合物的工作也有报道[12]。

通过 STM，能够更加清晰地了解蛋白质的结构图谱，为超级分子材料的设计和药物载体的构建等前沿研究提供帮助[13]。

2.1.3. 生物膜的研究

生物膜的尺寸相对于核酸和蛋白质更大，这方面的研究往往是结合其它显微技术的应用，在不同的层次上进行综合观测。

1987 年，瑞士巴塞尔大学的一个研究小组开始了生物膜的 STM 研究，他们探索了由自由电子显微镜得到的结构信息 STM 图像之间的相关性。研究还表明，细胞的 STM 研究有助于揭示某些离子在膜间的运输过程[14]。

2.2. 原子力显微镜

原子力显微镜(AFM)可在近生理条件下进行高分辨成像，且样品制备简单，不需要特殊标记等特点，已经在生物学领域获得了广泛的应用，如单个生物大分子成像、分子间相互作用力的测量、细胞膜表面细微结构与功能关系的研究等。但是，大多数生物分子的移动、构型和构象的变化、以及相互作用等多发生在极短时间内，普通 AFM 很难捕捉它们的动态过程。快速 AFM (HS-AFM)可以在 100 ms 甚至更短的时间内扫描一幅图像，大大提高了成像速度，使原来无法检测到的中间过程，在 HS-AFM 上得到了实现。这种兼顾空间和时间分辨率的检测技术，对深入理解生命的奥秘具有重要作用[15] [16]。

2.2.1. 生物分子领域

生物分子是生命活体的基本单位，对生命研究具有至关重要的作用。利用 AFM 可以对生物分子进行高分辨力的成像，包括蛋白质、核酸、碳水化合物等。比如，已经成功地使用 AFM 研究了蛋白质聚合物的二级合三级结构、生物大分子在溶液中的分子构象等。

AFM 还可以用于测定蛋白质分子的粘附强度和机械性质，为进一步探究生物分子的结构和功能提供了有力的工具。

2.2.2. 细胞器和细胞表面领域

细胞器是细胞内功能区域，包括内质网、高尔基体、溶酶体等。AFM 可以直接观察这些细胞器的结构，比如细胞核内的染色体的形态、蛋白质分子的聚集形态等。

AFM 还可用于在实验室环境中研究细胞外基质(如胶原蛋白等)与细胞表面的相互作用，以及细胞表面上的蛋白质分子、脂质体等的分子构象和生理功能。这些观察为进一步理解细胞结构与功能提供了细胞水平的数据支撑。

2.2.3. 微生物领域

微生物是现代生物学研究的重要对象，包括细菌、真菌、病毒等。AFM 可以用于对微生物表面的直接成像，如病毒、霉菌和细菌等的表面面貌。

通过 AFM 技术可以观察到微生物的细节结构，如梅毒粒子、菌丝等的形态，是进一步研究其生长特性和抗药性等的基础。跟其它电子显微镜相比，AFM 具有独特的样品扫描方式和高灵敏度，更适用于一些高密度和胞膜状样品的观察。

2.2.4. 纳米材料领域

纳米材料是纳米生物学的研究范畴，纳米生物技术是指用于研究生命现象的纳米技术，它是纳米技

术和生物学的结合，同时也是一门涉及物理学、化学、量子学、机械学、材料学、电子学、计算机学、生物学、医学等众多领域的综合性交叉学科[17]。

随着人类对纳米材料的研究越来越深入，AFM 也逐渐被用于纳米材料领域。由于 AFM 具有高分辨率、非破坏性等优势，可以对纳米材料进行高精度的表征。比如，可以通过 AFM 直接观察和测量纳米线、纳米颗粒的形态、尺寸、分布等特性；还可以将 AFM 用于研究纳米材料的力学性质，如弹性模量、硬度等。

2.2.5. AFM 在生物学领域的应用前景

在生物学领域，AFM 以其分辨率高、样品制备简便、制样过程对样品原始形态影响小、能在生理条件下进行动态研究等优点备受青睐。后基因组即蛋白质组的研究已提上日程，想要了解蛋白质的功能首先要了解其结构，AFM 提供了这样一个平台；作为一种观测手段，AFM 可通过对肿瘤细胞的形态来判断肿瘤的类型与属性，从而起到肿瘤诊断作用；作为一种改造手段，AFM 可对被观察标本直接进行纳米级的人工操作，以达到对病理细胞进行手术的目的，这样便有可能对肿瘤进行治疗。虽然到目前为止，AFM 研究中还存在针尖污染、针尖对样品的影响等不利因素，但随着物理理论和材料科学技术的发展，它将会在生命科学领域发挥更大作用。

AFM 可达到原子级的分辨率和毫秒级成像，理论上任何在毫秒内发生的生物过程，都能进行结构和动态的研究。如上所述，科学家们已利用 AFM 观察到了许多传统检测技术和方法无法看到的“分子事件”的动态过程，为生命过程的研究提供了独特的、不可多得的手段。然而，AFM 也有其自身的局限性，如：多用于研究较纯的生物样品或相对独立的生物分子的动态。另外，提高探针的共振频率，扫描速度可以达到 100 帧/s，但扫描范围通常只有 20 nm × 20 nm，这些还远不能满足多数生物分子的成像需求。AFM 与其它仪器联用，能够克服自身的一些局限，扩大它的使用范围。如 AFM 与 X-射线晶体分析仪或表面增强拉曼光谱的联用，已成功对 2-半胱氨酸-抗氧化酶蛋白的结构进行了解析，并证明了脂筏在鼠诺如病毒的感染中起到了重要作用。因此，采用 AFM 与其它仪器联用的方式，研究多种生物反应过程和生命现象，解决传统生物学方法难以揭示的现象和规律，是目前 AFM 发展的主要趋势[18]-[22]。

可以预见，随着 AFM 技术的发展，AFM 已具备了观察生化反应过程及生物分子构象变化的能力，在生物学领域中展现出了非凡的优势。随着仪器技术本身和相关联用技术的完善和改进，符合生命科学研究需要的 AFM 将在生物学领域中具备广阔的应用前景，有望成为生物学领域的重要研究工具之一。

3. 结语

自 20 世纪 70 年代以来，由于电子显微镜分辨率的不断提高并与电子计算机的结合应用，许多分子生物学的现象，例如 DNA 的转录、DNA 分子杂交等在生物化学中用同位素技术可证实或可在电子图像中获得直观的证实；许多生物大分子的结构和功能可从电子图像的分析中加以认识。

总之，利用显微技术进行的生物学研究可以反映细胞水平、超微结构水平，甚至分子水平三个不同的层次的信息。

AFM 是一种非常优秀的观测生命科学和纳米材料的高分辨率显微技术，已经广泛用于生物学中各个领域。但是，高分辨率的成像仍然是研究的基础，对于生物学的深入研究和理解仍然需要大量的实验研究和理论分析。

参考文献

- [1] 商之讯 TQ. 谁发明了显微镜[EB/OL]. <https://localsite.baidu.com/okam/pages/article/index?categoryLv1=%E6%95%99%E8%82%B2%E5%9F%B9%E8%A%EAD&ch=54&srcid=10004&strategyId=134837653473271&source=natural>, 2024-05-29.

- [2] 百度题库. 世界上第一个发明显微镜的人是谁? [EB/OL]. <https://tiku.baidu.com/bigque/question/015d1b4f767f5acfa1c7cd49?tosite=wenkutiku>, 2024-05-29.
- [3] Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., *et al.* (2019) Coming Together to Define Membrane Contact Sites. *Nature Communications*, **10**, Article No. 1287. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09253-3>
- [4] Cosson, P., Amherdt, M., Rothman, J.E. and Orci, L. (2002) A Resident Golgi Protein Is Excluded from Peri-Golgi Vesicles in NRK Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 12831-12834. <https://doi.org/10.1073/pnas.192460999>
- [5] 周汉秋, 朱殷铷, 韩鸿怡, 等. 基于受激发射损耗显微术的活细胞和活体超分辨成像[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(3): 513-528.
- [6] 恩斯特·奥古斯特·弗里德里希·鲁斯卡——“电子显微镜之父” [EB/OL]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1764521501009418362&wfr=spider&for=pc>, 2024-05-29.
- [7] 蝌蚪五线谱. 电子显微镜的发展历程[EB/OL]. <https://www.kedo.net.cn/c/2018-11-09/950444.shtml>, 2024-06-07.
- [8] 百度百科. 海因里希·罗雷尔[EB/OL]. <https://baike.baidu.com/item/%E6%B5%B7%E5%9B%A0%E9%87%8C%E5%B8%8C%C2%B7%E7%BD%97%E9%9B%B7%E5%B0%94/7570216>, 2024-05-29.
- [9] Beebe Jr., T.P., Wilson, T.E., Ogletree, D.F., *et al.* (1989) Direct Observation of Native DNA Structures with the Scanning Tunneling Microscope. *Science*, **243**, 370-372. <https://doi.org/10.1126/science.2911747>
- [10] Dunlap, D.D. and Bustamante, C. (1989) Images of Single-Stranded Nucleic Acids by Scanning Tunneling Microscopy. *Nature*, **342**, 204-206. <https://doi.org/10.1038/342204a0>
- [11] Driscoll, R.J., Youngquist, M.G. and Baldeschwieler, J.D. (1990) Atomic-Scale Imaging of DNA Using Scanning Tunneling Microscopy. *Nature*, **346**, 294-296. <https://doi.org/10.1038/346294a0>
- [12] 李民乾, 姚小未. 扫描隧道显微镜及其在生命科学中的应用[J]. *物理*, 1991(4): 207-209.
- [13] 扫描隧道显微技术-提高精度解构蛋白质[EB/OL]. <https://zhuanlan.zhihu.com/p/643474429>, 2024-05-31.
- [14] 马立农. 细胞膜离子通道及其检测技术的研究进展[EB/OL]. <https://www.docin.com/p-1624264918.html>, 2024-06-07.
- [15] 刘林, 魏余辉, 刘文静, 等. 快速原子力显微镜技术在细胞生物学中的应用新进展[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(8): 931-937.
- [16] 原子力显微镜在生物学中的应用[EB/OL]. <https://wenku.baidu.com/view/60a3607613a6f524ccbff121dd36a32d7375c7e6.html?wkts=1717191101782&bdQuery=%E5%8E%9F%E5%AD%90%E5%8A%9B%E6%98%BE%E5%BE%AE%E9%95%9C%E5%9C%A8%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6%E4%B8%AD%E7%9A%84%E5%BA%94%E7%94%A8&needWelcomeRecommend=1>, 2024-06-01.
- [17] 百度百科. 纳米生物技术[EB/OL]. <https://baike.baidu.com/item/%E7%BA%B3%E7%B1%B3%E7%94%9F%E7%89%A9%E6%8A%80%E6%9C%AF/3351098?fr=aladdin>, 2024-06-01.
- [18] Watanabe, H., Uchihashi, T., Kobashi, T., Shibata, M., Nishiyama, J., Yasuda, R., *et al.* (2013) Wide-Area Scanner for High-Speed Atomic Force Microscopy. *Review of Scientific Instruments*, **84**, Article 053702. <https://doi.org/10.1063/1.4803449>
- [19] Kodera, N., Sakashita, M. and Ando, T. (2006) Dynamic Proportional-Integral-Differential Controller for High-Speed Atomic Force Microscopy. *Review of Scientific Instruments*, **77**, Article 083704. <https://doi.org/10.1063/1.2336113>
- [20] Mikheikin, A., Olsen, A., Picco, L., Payton, O., Mishra, B., Gimzewski, J.K., *et al.* (2016) High-Speed Atomic Force Microscopy Revealing Contamination in DNA Purification Systems. *Analytical Chemistry*, **88**, 2527-2532. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04023>
- [21] Casuso, I., Kodera, N., Le Grimellec, C., Ando, T. and Scheuring, S. (2009) Contact-Mode High-Resolution High-Speed Atomic Force Microscopy Movies of the Purple Membrane. *Biophysical Journal*, **97**, 1354-1361. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.019>
- [22] Charoenwattanasatien, R., Tanaka, H., Zinzius, K., Hochmal, A.K., Mutoh, R., Yamamoto, D., *et al.* (2018) X-Ray Crystallographic and High-Speed AFM Studies of Peroxiredoxin 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, **74**, 86-91. <https://doi.org/10.1107/s2053230x17018507>