

得了喜人的成绩. 现在是我国表面科学家介入 STM 的时候了, 当然也是我国科技管理部门大力支持他们的时候了.

参 考 文 献

- [1] G. Binnig and H. Rohrer, *Rev. Mod. Phys.*, **59**(1987), 615.
- [2] L. E. C. van de Leemput and H. van Kempen, *Rep. Prog. Phys.*, **55**(1992), 1165.
- [3] J. F. Jia, R. G. Zhao, W. S. Yang, *Phys. Rev. B*, **48**(1993), 18101, 18109.
- [4] R. G. Zhao, J. F. Jia, W. S. Yang, *Phys. Rev. B*, **48**(1993), 5333;
R. G. Zhao, Yun Zhang, W. S. Yang, *Phys. Rev. B*, **48**(1993), 8462.
- [5] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber et al., *Phys. Rev. Lett.*, **50**(1983), 120.
- [6] K. Takayanagi, Y. Tanishiro, M. Takahashi et al., *J. Vac. Sci. Technol. A*, **3**(1985), 1502.
- [7] Zheng Gai, R. G. Zhao, Yi He et al., *Phys. Rev. B* (已接受).
- [8] W. S. Yang, X.-D. Wang, K. Cho et al., *Phys. Rev. B*, **51**(1995), 7571.
- [9] Yanfang Li, Jianxun Mou, Junjue Yan et al., *Acta Physica Sinica* (Overseas edition), **2**(1993), 128, 139.
- [10] J. X. Mou, J. J. Yan, W. J. Sun et al., *J. Vac. Sci. Technol. B*, **9**(1991), 1566.
- [11] Jianxun Mou and W. S. Yang, *Ultramicroscopy*, **42-44**(1992), 1025.
- [12] Hongbin Yu, Junjue Yan, Yanfang Li et al., *Surf. Sci.*, **286**(1993), 116.
- [13] Junjue Yan, Zhigang Li, Chuanyong Bai et al., *J. Appl. Phys.*, **75**(1994), 1390.
- [14] Junjue Yan, Honbing Yu, Zigang Li et al., *Chinese Sci. Bull.* (English edition), **39**(1994), 797.
- [15] W. S. Yang, X.-D. Wang, K. Cho et al., *Phys. Rev. B*, **50**(1994), 2406.
- [16] 盖峥、何谊、杨威生, 物理学报(已接受).
- [17] Zheng Gai, Hang Ji, Yi He et al., *Surf. Sci. Lett.*, **338**(1995), L851.
- [18] Zheng Gai, Yi He, Hongbin Yu et al., *Phys. Rev. B* (已接受).

探索生物大分子活动奥秘的光学手段*

唐 广 陈润生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

唐 孝 威

(中国科学院高能物理研究所, 北京 100039)

摘 要 将先进的物理学技术, 尤其是光学技术应用于分子生物学, 进行生物大分子操纵、探测与成像, 会给生物学家们带来更强有力的实验武器. 文章主要介绍了光钳技术、近场光学技术和视频增强的光学显微术.

关键词 光钳, 近场光学, 近场扫描, 视频增强的光学显微术

Abstract An overview is presented of the application of state-of-the-art technology, in particular optical techniques, in molecular biology. The use of optical tweezers, near-field optics and video-enhanced light microscopy in the manipulation, detection and imaging of biological macromolecules is described.

Key words optical tweezer, near-field optics, near-field scanning, video-enhanced

* 1995年12月5日收到初稿, 1996年3月19日收到修改稿.

今天,以分子生物学为代表的生命科学已成为自然科学领域中最具吸引力的学科之一。生命科学的复杂性和丰富的研究材料,吸引了大批数学、物理、化学、计算机等领域的研究工作者。他们的介入,也给生物学领域注入了新的活力,带来了新的技术。尤其是先进的物理实验手段在生物学中的应用,将大大加速生物学研究进程,带来突破性进展。

自从虎克用显微镜观察到软木切片中的细胞以来,借助显微镜,生物学摆脱了博物学的狭小天地,建立了细胞学说,被恩格斯誉为19世纪自然科学的三大成就之一。随着电镜、X射线、核磁共振(NMR)的应用,生物学取得了突破性的进展,解开了双螺旋的奥秘,窥测到蛋白质分子复杂、精巧的内部结构。人类的研究触角深入到生物大分子的结构,建立起分子生物学。但是,要探索生物大分子结构与功能的奥秘,观测大分子反应的动态过程,开辟结构生物学的新时代,必须借助更强有力的实验手段。

1995年夏,我们进行了一次范围广泛的文献调研,主要目的是寻找当前国际上应用于生物学的最新实验技术手段。调查发现,光学领域有很多新的实验技术适用于生物大分子结构研究,尤其是动态的结构、功能研究和成像。这些手段有很多优点,如:不破坏样品,价格低廉,高速、可靠,应用范围广,设备易维护,使用方便,结果直观可视等等,因而倍受人们青睐。

1 “光钳”(optical tweezer)技术

人们知道,光子动量为

$$p = E/c = h\nu/c,$$

其中 h 为普朗克常数, ν 为光频率。

光子与物质相互作用时,由于反射或折射,其动量 p 将发生改变 (Δp), 将其传递给被作用物体 ($-\Delta p$), 因而被作用物体受一冲量 ($F\Delta t$),

$$F\Delta t = -\Delta p,$$

其中 Δt 为动量作用时间, F 即为反射光或折射光的物体所受光压力。

虽然“光压”的概念早在1901年就已提出,但由于光压极微弱,普通实验条件下难以观测到其宏观效应。光压的实际应用是在激光器产生之后,利用激光动量“转移”产生的辐射压,可以“抓住”或“操纵”微小物体,如胶体微粒、分子、甚至原子等。范围从数十微米的颗粒到数埃的瑞利粒子。这里,激光的作用犹如一把精巧的“钳子”,所以这种技术称为光钳技术。

只要被钳微粒与周围环境介质的折射率不同,就可选择合适的激光输出模式(如微粒折射率大于周围介质折射率时,用TEM₀₀模),在这种情况下,激光能量由光轴向外指数衰减,激光能量对轴分布呈高斯分布;激光经微粒折射后,方向发生偏转产生一个梯度力场,若微粒偏离轴线,则产生一个指向轴线的回复力,将其约束在光束中央,并可随光束移动而移动^[1]。显然,若光束的强度越大,则该光束对小球的约束作用就越大,即“钳”得越紧。

光钳实验装置通常包括四个部分:激光器,聚焦系统,样品室和观测系统,其设备是廉价易行的。最早的生物应用是1987年美国AT&T和Ashkin小组用此方法“钳”住微生物——烟草花叶病毒和细菌^[2],以及线粒体^[3]等细胞器。他们观察到存在于样品室的活体微粒,在此光学“陷阱”中可以继续存活。

随着技术的改进,“光钳”不仅能钳住细胞和细胞器,而且成为一种重要的单分子操纵技术。为避免大分子吸收激光能量产生温升,导致变性,可将大分子偶联上一个透明小球,通过拖动小球带动大分子。国外已有成功实验,用此办法带动膜蛋白在膜上移动^[4],通过单个蛋白在运动中所遇到的阻碍情况,可探知膜的亚显微结构,如表面蛋白分布及细胞骨架对膜结构的支撑作用。可避免传统的光致漂白荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)方法对荧光粒子造成的不可逆破坏作

用。“光钳”还被用于通过拉伸染色体或 DNA 分子,观测其弛豫特性^[5-6],从而在单分子水平上研究其动力学特性和热力学特性,改变了过去只能从大分子集合和统计行为中研究这些特性,上述的进展对理解有丝分裂过程及染色体复制动力学等重大生物学问题均有重要意义。

我们相信,光钳不论是在细胞、细胞器,还是在大分子的操纵上都将成为生物学家们的锐利武器。

2 近场扫描光学显微镜(near-field scanning optical microscopy, NSOM)

通常实验观测中用的光学显微镜都是远场的显微镜,因为其光学器件孔径和物镜与样品间探测距离都远大于光波长。在远场条件下的光学显微镜,其探测精度受阿贝散射限制(探测极限为 $\lambda/2$)。由于可见光的波长都是数百纳米,所以观察的分辨率也只能到几百纳米。而探测大分子通常都需要纳米级甚至亚纳米级的精度,因此在可见光波段用远场光学观察生物大分子的状况与行为是不可行的。为了突破此限制,多年来科学家们主要采取了两种策略:一是使波长更短,如采用 X 射线、电镜,波长可以从几个埃到零点几埃,其探测精度可达 0.1Å ($1\text{Å}=0.1\text{nm}$);二是采用各种型式的扫描探针显微镜(scanning probe microscopy, SPM),如扫描隧道显微镜(STM),原子力显微镜(AFM)^[7]等。上述方法都已用于实践,取得很多成果。但上述两种策略都有一定的缺陷,牺牲了光学探测的一些固有优点。用 X 射线只能观测晶体结构,而蛋白质晶体生长的困难是众所周知的;电镜设备昂贵,而且要在真空下探测;同时二者都是在对样品很强扰动下观察,其离子辐射对样品尤其是生物样品损害极大,并且无法观测分子动态行为。STM 和 AFM 可用于观测单个分子,但仍旧有电场或接触力的作用,尤其是探测软的有机物分子或生物分子时更为突出。

近年来国际上发现了近场光学探测的方法(即光源、探测距离小于波长),不仅可以突破 $\lambda/2$ 的精度限制^[8-10],而且保持了前述光学探测的诸多优点。近场光学的原理早于 1928 年即已提出。但真正实现近场光学显微镜有两个技术困难:(1)需要一个亚波长光源并且具有足够强度;(2)样品需要用探针很快地扫描。随着精密加工工艺和激光技术的发展,制作一个很尖的探针作为亚波长光源,并使其具有足够强度已不成问题。同时,扫描探针显微镜的发展,采用计算机控制的精密的压电伺服系统已能使探针尖在距样品几个纳米距离进行很快扫描。

近场扫描光学显微镜的探测精度不受 $\lambda/2$ 的阿贝散射限制,只取决于探针尺度和探针与样品距离(由于制作工艺的发展,这些都可以做得远小于光波长),所以可达到 $\lambda/2000$ 的精度。其装置关键在于探针,其余扫描装置与 STM 和 AFM 相似。另外,需一些光路设备及中央处理器、图像监视器等。探测时,用针尖在贴近样品几纳米至几十纳米处很快地扫描,在此距离满足近场条件,收集样品表面的迅衰场,获取其图像和光谱信息。70 年代末期,即有人用微波实现 $\lambda/50$ 的探测,从实践上突破散射限制,证明了近场探测的可能性。近几年,近场光学技术更是突飞猛进,探针也做了很大改进^[11],如:从早期的亚波长圆孔探针发展了尖的金属膜覆盖的光纤探针;尖的不用金属膜覆盖的光纤探针;金属尖探针;半导体材料的尖探针。并且采用调制技术,让针尖以一定频率上下振动,对针尖上的扩散光加以调制,以区别于环境杂散光,再进行同步探测,可以大大提高信噪比。已有报道用硅针尖采用上述调制方法,获得了 1nm 的探测精度^[12],并且从理论上证明探测精度可达到原子水平。

目前,近场光学在生物学中的应用刚刚开始,但已经显示出很好的前景。可用来观测大量活细胞中的动态分子行为^[13],如单个膜离子通道、膜受体的成像及其如何改变构像,如何控制离子流;可进行原位的 DNA, RNA 测序;可从分子水平观测细胞中有丝分裂代谢等动力学

过程等等。

3 视频增强的光学显微术(video-enhanced light microscopy, VELM)

如果能将光学观察信号与视频增强和数字图像处理技术相结合,会大大提高光学显微图像的质量。这就是视频增强的光学显微镜,它主要是通过两种相关的方法来实现^[14]:

3.1 视频增强的荧光显微术(video-enhanced fluorescence microscopy, VIFM)

用高敏感的低照度视频相机连在传统荧光显微镜上探测荧光标记样品的信号,能够清楚地看到不能直接进行显微照相的弱荧光信号。解决了光致漂白的问题,探测时间比普通荧光显微镜长得多。由于这种技术采用了数字图像处理器(digital image processor)增强信号,所以又称作数字成像荧光显微术(digital imaging fluorescence microscopy)。

3.2 视频增强的对比显微术(video-enhanced contrast microscopy, VECM)

高分辨率高照度的视频相机,应用 Nomarski 光学接受非常规匹配光学信号,采取模拟和数字的对比增强方法及背景图像减弱以提高图像质量,能清楚地看到小到微管,快如轴突运输的信号。其观测精度也突破了传统光学显微镜 $\lambda/2$ 的限制。

视频增强光学显微镜的设备并不复杂,只是普通光学设备和电子设备简单、经济的结合,一套设备能完成两种功能(VECM 和 VIFM)。其主要设备是一个大的、稳定的、高质量的光学显微镜,需要防震装置,无尘环境。显微镜要连上一两个视频相机(或别的成像装置)。一般用单色视频相机即可。若采用固态电荷耦合器件(charge-couple device, CCD)阵列探测更佳。其核心是一个数字图像处理器,将相机传输的模拟信号转换为数字信号,进行一系列图像优化处理,再将处理后的信号进行数模转换显示出来。这项技术最早用于卫星图像处理。

这项技术本身促进了光学显微镜对于活细胞的研究,如:微弱荧光图像的增强;细小细胞结构对比图像的增强。从而可记录正常细胞内的活动。可以方便地研究细胞内显微结构的动力学^[15],如观察细胞内膜泡在单个微管上的运输,观测胶体金标记的活细胞内生物大分子动态等。它在某种程度上弥补了传统光学显微镜的分辨率缺陷,利用其视场宽广,便于观测活细胞的优点。目前这项技术在国际上已日趋普遍。

以上介绍了三种新的光学技术手段在生物中的应用,这些技术并不复杂,设备也相对是廉价的。其中光钳技术提供了操纵生物大分子或生物大分子集合的手段;近场光学技术提供了高精度探测分子事件的方法;视频增强的光学显微术可以整体、动态地提高观测对象的清晰度。三者是一套完整的分子水平的操纵、探测和成像技术。结合发展这三种技术,将其应用到分子生物学研究中,将为研究生物大分子结构与功能提供强有力手段,我们期待这些技术能尽快地应用于我国细胞和分子生物学研究,尽快赶上国际先进水平。

参 考 文 献

- [1] 田兆斌、夏道莲,物理,23(1994),345.
- [2] A. Ashkin et al., *Science*, 235(1987), 1517.
- [3] A. Ashikin et al., *Nature*, 348(1990), 346.
- [4] Ken Jacobson et al., *Science*, 268(1995), 1441.
- [5] Thomas T. Perkins et al., *Science*, 264(1994), 822.
- [6] Thomas T. Perkins et al., *Science*, 268(1995), 83.
- [7] Othmar Marti et al., *INC STM and SFM in biology*, Academic press, (1993).
- [8] E. Bertzig et al., *Science*, 251(1991), 1468.
- [9] E. Bertzig et al., *Science*, 257(1992), 189.
- [10] E. Bertzig et al., *Science*, 262(1993), 1422.
- [11] Y. Inouye et al., *J. Microscopy*, 178(1995), 14.
- [12] F. Zenhausern et al., *Science*, 269(1995), 1083.
- [13] X. Sunny et al., *Science*, 265(1994), 361.
- [14] David M. Shotton, *J. Cell. Sci.*, 89(1988), 129.
- [15] D. W. Fairbairn et al., *Cell Bio. Int.*, 18(1994), 195.