

## 近场光学显微镜下的生物世界\*

沈玉民 朱星

(北京大学物理系 北京 100871)

**摘要** 扫描近场光学显微镜由于其超过常规光学显微镜的光学分辨能力及其一些特殊的功能,正在受到生物学家们越来越多的关注.文章介绍了近年来近场光学显微技术在生命科学中的应用和进展.

**关键词** 扫描近场光学显微镜,单分子探测,细胞,染色体

## THE BIOLOGICAL WORLD UNDER A SCANNING NEAR-FIELD OPTICAL MICROSCOPE

SHEN Yu-Min ZHU Xing

(Department of Physics, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** Due to its super-resolution compared with conventional optical microscopes, the scanning Near-field optical microscope is attracting more and more notice from life scientists. Its applications in biological studies and progress over recent years is reviewed.

**Key words** scanning near-field optical microscope, single molecule detection, cell, chromosome

早在3个世纪以前,荷兰的业余科学家 Antoni van Leeuwenhoek (1632—1723) 就将他发明的光学显微镜应用于对原生动物、细菌、血红细胞、毛细血管以及昆虫的循环系统的广泛的研究之中.可以说,光学显微术从它诞生的那一天起,就与生物领域的研究结下了不解之缘. Leeuwenhoek 发明的单镜片显微镜的分辨本领达到了令人惊异的  $2\mu\text{m}$ ,大大超过了同时代组合透镜约  $5\mu\text{m}$  的分辨本领.当时光学显微镜最严重的问题是光学镜片的像差和色散.然而当现代技术可以将像差和色散消减到近乎完美的时候,人们仍然不能用光学显微镜分辨  $\sim 300\text{nm}$  以下的物体.

那么,问题到底出在哪里呢?原来,光学显微镜的放大本领来源于光的波动性,而正是光的波动性阻碍了人们无限地增加放大倍数.这个规律早在1873年就由德国科学家 E. Abbe 根据衍射理论推导出,而后由 Rayleigh 归纳为一个常用公式:

$$\Delta x = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \theta'}$$

其中  $\Delta x$  为光学显微镜的最小分辨距离,  $\lambda$  为照明光的波长,  $n$  为物方折射率,  $\theta'$  为物镜对样品的半张

角.  $n \sin \theta'$  称为数值孔径 (NA). 由上式可见,要想提高光学显微镜的分辨本领,就必须减小照明光波长  $\lambda$ , 或增大数值孔径 NA. 就增大数值孔径而言,最好的油浸式显微镜的 NA 也不过 1.5 左右. 也就是说,假如使用  $500\text{nm}$  的入射波长,仅可以得到  $200\text{nm}$  的分辨率.

在生命科学进入“后基因组时代”(postgenome)的今天,生物学家研究的重点已经由对基因组的研究转到对蛋白质组的研究.细胞生物学家为了了解遗传与发育的关系,迫切想要知道:基因组怎样在细胞内得到表达;生物大分子——主要是结构蛋白与 RNA 及其复合物如何组成细胞的基本结构体系;以及一系列重要的活性因子如何调节细胞的主要生命活动,如细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡与细胞信号传递等.反映这些体系性质的特征尺度都在纳米的量级,超出了常规光学显微镜的分辨极限.因此生物学家迫切希望有一种实验显微方法,它既具有亚微米甚至纳米尺度的光学分辨本领,又可以连续监测

\* 国家自然科学基金和“九五”重大基金资助项目  
1999-04-22 收到初稿, 1999-05-25 修回

生物大分子和细胞器微小结构的演化,而并不影响生物体系的生物活性。

近场光学显微技术(near-field optical microscopy)的出现为解决上面的难点带来了希望<sup>[1]</sup>。与常规光学显微镜的二维同时成像不同,这一新技术采用距样品表面仅几个纳米的探针逐点扫描成像的方法,可以在几十纳米的分辨率下同时得到样品微区的形貌和光学信息。扫描近场光学显微镜(scanning near-field optical microscope, SNOM)可望为生物学家进军纳米生物世界的兵器库提供一种新式武器,这种技术可以用来在生物学的自然环境或接近自然条件下研究分子水平的荧光以及光的吸收、散射和偏振的光学信息,其原理见图1。

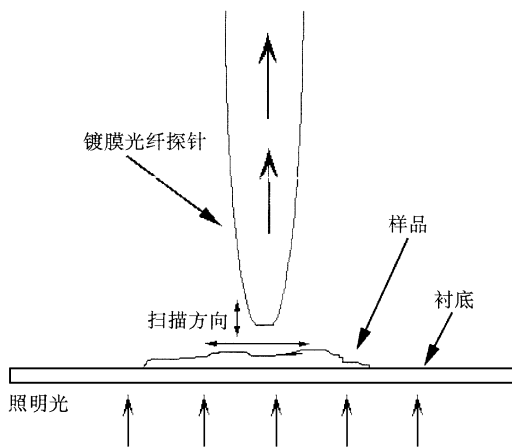


图1 SNOM原理示意图  
(本图为透射收集模式)

## 1 对单个荧光分子的特写

人们对生物的长期研究已经发展了多种多样行之有效的荧光染色标记方法,可以将染色剂大分子直接安置在生物组织的某一个特定的感兴趣的位置上。对荧光分子的定位可以用来实现DNA快速测序,而对其光谱及荧光寿命的研究则可以提供该微区内的能态及价键的信息,从而对发生在表面的化学过程实现跟踪分析。但是,在SNOM出现以前,人们还不能研究被定位于某一区域内的单个荧光分子。

1992年,AT&T贝尔实验室的Eric Betzig和他的同事在近场光学显微镜实用化方面迈出了重要的一步,利用他们自己创新研制的镀膜光纤探针扫描近场光学显微镜,得到了 $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$ 区域内吸附在30nm厚的PMMA膜上的染料分子探针 $\text{DiIC}_2(3)$ 的分布(见图2)<sup>[2]</sup>。所得到的单个分子的相对位置可以确定到5-15nm( $\lambda/120 - \lambda/40$ ),其光强分布信息可以很好地被理论解释,并可以由此推断出这些染料分子的取向。

这一技术可以应用于许多方面,比如可以观察分子在细胞膜上的分布,监测蛋白质分子构型的变化,甚至在自然环境下研究分子水平上的生化反应过程。由于在SNOM的机制中,样品中受到光学激发的体积(照明模式)或被探测的发光区域(收集模式)都非常小,因此可以做到单分子探测的灵敏度。

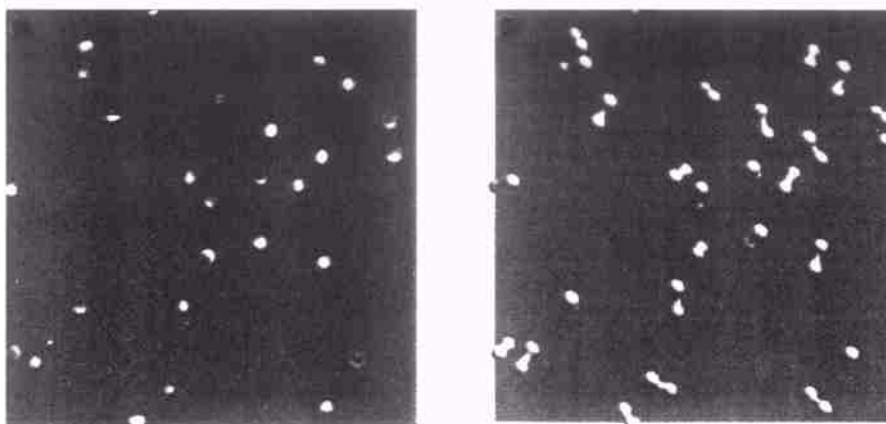


图2 由 $\text{DiIC}_2(3)$ 的SNOM光学像推断分子取向<sup>[2]</sup>  
(a)光学像; (b)推断出的分子取向

这样就可以使用像碳青素(carbocyanine)这样只有一个发色团(色基)的染色剂,在更小的尺度上标定

生物组织,比如一个细胞的细节,再利用SNOM予以研究。正如Betzig所说的那样,“没有人会想用一

个保龄球去标记一只跳蚤的!”

因为由 SNOM 得到的光学图像来源于样品折射率及反射率的空间分布与表面形貌的信息(这主要是因为近场范围内得到的光强对探针与样品之间的距离很敏感)的混和,在当前对近场范围内光学信息的解释尚不很清楚的情况下,荧光衬度成为了 SNOM 研究生物样品的主要方式.因此,对单分子荧光特性的研究也成为 SNOM 研究的一个主要方向.实际上,分子荧光的光谱特性、荧光寿命都可以反映分子的内禀属性和分子所在环境的性质,比如 pH 值<sup>[3]</sup>.

但是,在扫描得到光学图像的过程中,探针究竟扮演了一个什么角色呢?从 SNOM 原理上讲,探针实际上是我们引入样品近场的一个扰动,它使得原来近场内的隐失场能量转化为可被我们探测的传播场能量,从而得到样品表面附近电磁场能量的分布.这个扰动不应该对我们所要探知的场分布产生过大的影响.研究中发现,当针尖的边缘靠近一个荧光分子时,探针的铝镀层会使荧光分子淬灭,缩短荧光寿命.荧光寿命作为针尖与分子相对距离的函数,当分子(sulfurhodamine)在针尖中心时达到最大值(2ns),而在边缘时约为1ns.远场得到的荧光寿命同分子在探针正下方时的荧光寿命基本相同.这说明由荧光衬度得到的结果并没有受到探针的太大影响<sup>[4]</sup>.

## 2 细胞和细胞器精细结构

对染色荧光分子的研究只是 SNOM 技术迈向生物领域的第一步.作为首先被光学显微技术发现和研究的细胞,自然而然就成为 SNOM 应用的主要方向之一.尽管细胞结构早就可以用电子显微镜研究到很精细的地步,但得不到细胞精细结构的光学信息总是一件憾事,尤其是那些具有光化学功能的细胞器(如叶绿体),如果能够了解它们在工作时到底发生了什么,那绝对是一件很吸引人的事.

1994年,美国太平洋西北实验室的谢晓亮(X. Sunney Xie)等人报道了他们小组利用 SNOM 研究最近几年才被发现的叶绿素系统中的一些独立蛋白合成物,如 LHC(light harvesting complexes)、PS I (photosystem I reaction centers)、PS II (photosystem II reaction centers),在 thylakoid 膜上的分布情况<sup>[5]</sup>,引起了广大研究者极大的关注.

Thylakoid 膜是植物中发生光合作用的地方.这

些蛋白合成物嵌在膜中,吸收阳光并通过一系列的转化成为植物自己的能量.它们在膜上的分布情况有助于了解不同合成物之间能量的处理机制.以前要研究这样的系统,一般是采取冰冻蚀刻后用电子显微镜成像的方法,会导致天然结构的破坏,并且无法得到光谱学性质.这些蛋白合成物都具有自己特有的光学特性(如荧光寿命),从而可以利用这一点来区分不同的合成物.在谢晓亮的样品中只包含 LHC II,切变力形貌像显示其厚度约为 6.5—9.5nm,得到的空间分辨率为 100nm.同时得到的荧光像显示膜上的发光是各向同性的,这与已知 LHC II 在双层膜上的紧密排列是一致的.他们的最终目标是用 SNOM 对光合作用膜的光谱成像,从而在分子水平上研究光合作用中包含的化学反应,包括电子转移、质子转移、能量转移以及蛋白质构型变化.

除了细胞器的膜以外,细胞膜本身也是一个很好的研究对象.1972年,由 Singer 和 Nicolson 创建的细胞膜的二维流体模型认为,细胞膜中的所有成分都可以自由移动.这种看法在最近几年被 Edidin 等人提出了质疑.他们认为细胞膜上的各种成分在膜面上呈区域分布,不同的区域由膜蛋白和类脂化合物的分布区分,区域的大小大约在几百纳米的量级.它的细节用常规显微镜是难于分辨清楚的,研究者自然而然想到了 SNOM.

Edidin 的小组用类磷脂荧光剂和荧光抗体对人体纤维组织母细胞细胞膜上的膜蛋白 HLA I 分子作了标记,然后用 SNOM 对其进行了观察.结果证明干燥固定的细胞上的荧光分布区域与用其他方法在活细胞上测得的膜区域大小是一致的<sup>[6]</sup>.他们又进一步改进系统,在液态环境下对试样进行了扫描<sup>[7]</sup>,所得到的分辨率优于 200nm.

SNOM 基本上属于一种表面分析的工具,分析细胞膜或核膜这样的二维结构还可以,能不能分析整个细胞或细胞内的结构呢?对细胞近场成像的主要困难在于:首先,细胞表面的形貌信息和细胞的光学信息总是耦合在一起的;其次,光学信号会在细胞内发生散射,增加了信息的复杂性;其三,在扫描过程中,很难保持样品上被探测(激发)区域大小的一致;其四,在垂直样品表面 z 方向上,需要较大的适应跟踪能力;最后,还需要能够从成百上千个细胞中选定 1 个并将 SNOM 的探针准确定位于其上<sup>[9]</sup>.现在看来,后 3 条关于探针的控制的问题相对来说还容易解决一些,更基本的仍是前两条中体现的怎样

从得到的复杂的光学信息中分离出有用的各个部分的问题.此外,探针本身的光学性质如光通量、截止频率等也对光学像的收集有极大的影响.正是由于这样的原因,由原子力方法得到高分辨的表面形貌像比得到高分辨的光学像要容易得多.为了检验 SNOM 对完整细胞的成像能力,人们尝试了纤维组织母细胞、白细胞和红细胞等多种细胞,还使用了一些图像增强的方法提高信噪比<sup>[8]</sup>.依照劳伦斯·伯克利国家实验室研究者的看法,因为探针能够接收的由样品表面发出的光,随着探针尖端与样品表面的距离的增大呈指数衰减,扫描近场光学显微镜可能并不适合研究完整细胞内的细胞器或是深埋在细胞内部的蛋白质,而更适合作为细胞膜抗体荧光染色研究的有力工具<sup>[9]</sup>.他们将血红细胞膜上的两种蛋白用红、绿两种荧光分别染色,在获得形貌像的同时,得到了荧光分布(最小能够分辨的特征尺度为 100nm),从而分析了两种蛋白在膜上的分布相关性(见图 3).



图 3 双荧光染色血红细胞  
(原图为彩色,本图中高亮斑点为绿色荧光,中等亮度斑点为红色荧光)<sup>[9]</sup>

不过,当光线穿过生物组织的时候,尽管由于散射而使信号极其复杂,但毕竟携带了生物组织内部的结构信息,也许并不是完全不能加以分析.用透射的方法对培育细胞在液态环境下进行的成像观察发现,由老鼠的角化细胞和正常肾母细胞扫描得到的光学图像显示有许多纤维状的结构,而同时得到的表面形貌图却不能反映这些细节.用相同的方法对黄杨木叶细胞及其他的一些植物细胞的成像观察并没有发现相似的结构.被测试的不同动物细胞的精细结构也不尽相同.这些细丝可以融合成一根粗纤维,或从核附近一直展开到细胞边缘<sup>[10]</sup>.用透射的方法还研究了神经元细胞膜下的微导管系统<sup>[11]</sup>.这些微导管负责运送蛋白质和细胞内产生的小囊泡到细胞的不同部分去.用光学方法得到的微导管最

细部分信号的半高宽为 26nm,与用电子显微镜得到的 25nm 的直径吻合.可见工作在透射模式下的 SNOM 系统起码可以被用来分析细胞膜附近浅层范围内的细胞骨架的结构.

### 3 基因在 DNA 及染色体上的定位

有了荧光分子探针的精确标定技术,再结合扫描近场光学显微镜同时得到微区光学像和形貌像的能力,如果用 SNOM 来做基因定位的工作,应该能够得到更精确的结果.一般研究不同碱基对(base-pairs)片段在 DNA 分子或染色体上的位置,都采用荧光原位杂交染色-荧光显微观察的方法.由于荧光显微镜分辨极限的限制,样品的空间分辨率只有 300nm 左右.也就是对于中期染色体时的染色体分布密度来说,用荧光显微镜可以达到 3 Mb(mega-basepairs)的分辨率,而在分裂期间可以达到 50kb(kilo-basepairs).用扫描近场光学显微镜可望把这个分辨率提高 10 到 100 倍.

图 4 是用 p1-79 和  $\alpha$ -spectrin 共杂交并用 CY-3 荧光染色的人类 1 号染色体有丝分裂中期时的扫描图像<sup>[12]</sup>.由图可以很明显地看出,调节物探针 p1-79 位于染色体短臂的尽头,并且展现出一些用常规荧光显微镜看不到的细节.在这个例子中,SNOM 的光学分辨率好于 100nm.

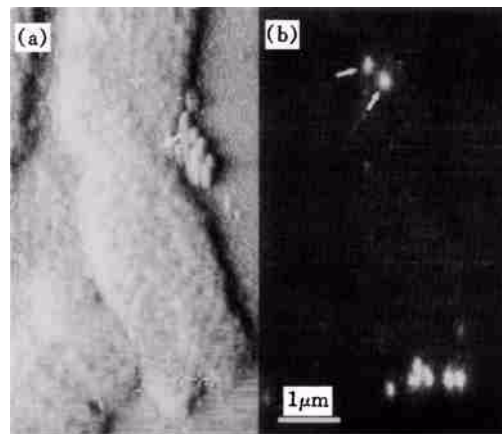


图 4 染色体荧光原位杂交染色  
(a)切变力形貌图; (b)同时得到的近场荧光像<sup>[12]</sup>

用 SNOM 对 600—800 个碱基对长的 DNA 片段的切变力表面形貌成像,得到的 DNA 片段像宽  $24 \pm 2\text{nm}$ ,高  $1.4 \pm 0.2\text{nm}$ <sup>[13]</sup>,光学像暂时还达不到这样的精度.但现有的技术已经可以在 1nm 的精度上定位并研究染色分子在 10ms—1000s 时间尺度上

的光学动态过程了。

#### 4 对细菌的观察

生物样品的近场光学研究大多是用染色剂着色进行观察的例子。用荧光染色的好处是可以比较容易地达到较大的信噪比,光学图像的本底小,从而便于分析。但在很多场合下不能染色,比如对活性细胞内结构的观察。此时由于生物组织的衬度反差很小,得到的图像可能会模糊成一片,结构的分析就会很困难。尽管如此,以色列的 Aaron Lewis 小组仍然用透射的方式得到了未染色细菌很好的近场光学像<sup>[14]</sup>。在他们得到的光学像中,由原子力形貌像给出的最厚的部分反而最亮,就好像光被会聚到一起,说明细胞内的结构起了光波导的作用。边缘的强吸收可能是由于厚细胞壁的高密度分子层造成的。此外,在强吸收边附近还找到两个强透射中心。根据同 TEM 图像的比较,这两个透射中心应该是包含遗传物质的内芽胞。由于它含有与环境不同折射率的物质,从而表现为波导。这充分说明 SNOM 对样品中折射率变化很敏感,可以在非染色条件下工作。

细菌的另一个重要结构是它的鞭毛和菌毛。鞭毛对细菌的运动起重要作用,而菌毛的功能还不太清楚。用 SNOM 可以在液态环境中对用常规光学显微镜无法观察的鞭毛和菌毛进行研究。已经有人以透射隐失波作为距离控制信号在水中,对沙门氏菌的鞭状细丝成像,获得的菌丝的光学像的半高宽为  $55\text{ nm}$ <sup>[15]</sup>。

#### 5 生物研究对 SNOM 技术的要求

Eric Betzig 是 SNOM 技术发展的奠基人之一。他在 1991 年前后发明的镀膜光纤探针和切变力控距及成像方法极大地促进了 SNOM 技术的发展。时至今日,当年他曾经指出的 SNOM 在生物领域的广泛应用已初见成果,但还远没有到最辉煌的时候。这项工作的困难部分来源于 SNOM 本身的特点,部分来源于生物系统的复杂性。

大部分生物样品是需要液体环境中研究的,发展 SNOM 在生物领域的应用必须发展液体中的扫描技术。溶液中的生物组织很柔软,为了避免探针拖带或损伤样品,探针控制必须有很高的灵敏度,但溶液本身却是提高灵敏度的最大障碍。一般采用的激光监测切变力控距方式中,监测激光很容易被液

面干扰,而液体对探针的阻尼又极大地降低了探针对针尖-样品相互作用大小变化的响应能力,使得液体中的成像分辨率比空气中低得多。不仅如此,切变力方式中针尖的振动还可能在溶液中形成驻波,对成像构成极大的扰动。相比之下,轻敲模式的控距方式在减小干扰方面要优于切变力模式。因为轻敲模式中探针为垂直于样品表面的上下振动,这样对溶液的影响要小得多。另一方面,生物样品大多具有复杂的表面形貌。对于跟踪大起伏复杂表面的要求来说,轻敲模式是一种很好的选择。在轻敲模式下,系统不但有很强的表面跟踪能力,而且保持了高的分辨率,同时悬臂探针对样品的作用力也比其他方法小<sup>[16]</sup>。这种方法可以跟踪大到微米量级,小到  $1.5\text{ nm}$  的高度变化。为了减少溶液对探针的影响,实验中一般尽量减少溶液的深度。

研究动态过程是 SNOM 的另一个目标,比如研究细胞骨架搭建、有丝分裂、细胞核凋亡与重建的过程等等。大家之所以在这个方向上对 SNOM 抱有厚望,是因为与其他手段相比 SNOM 对样品的影响较小而又具有较高的分辨能力。但不同于常规显微镜系统的衍射成像机制,SNOM 是通过逐点扫描成像的,速度不可能很快。成像速度主要决定于扫描点阵的大小、样品的发光强度和扫描系统的光耦合效率,一般获得一幅  $256 \times 256$  像元的光学像需要 40 min 以上的时间。这样一个时间尺度对于大部分生物化学过程来说,还是太长了一些。因此,人们正在寻找一种更快的成像方法,现在主要是通过提高探针的光耦合效率和光子探测的信噪比来减少探针在每一点的驻留时间。

另一方面,尽管现在的 SNOM 的光学分辨率要优于常规光学显微镜,但还不足以满足生物研究的需要。由于 SNOM 获得的分辨率主要决定于用于扫描的探针的尖端尺度,原则上最终可以得到原子级的横向分辨率。但探针尖端尺度越小,探针对光的耦合能力就越弱,最终导致分辨能力的下降。因此,在分辨能力和成像时间上总存在一个平衡。

#### 6 小结与展望

综上所述,近场扫描光学显微镜在生命科学领域的应用可以归结为以下 3 个主要方向。

首先,可以利用比普通光学显微镜更高的分辨率作荧光精确定位的工作。在这方面的的工作做得最多,得到的结果也最令人振奋。为了获得更好的结

果,还需要在仪器方面下功夫,进一步提高分辨率和微定位控制精度.

其次,可以利用得到的微区光学信息分析微结构和生物化学过程.当前近场光学研究最重要也最困难的一环,也许应该是近场范围内光的传播及与物质相互作用的理论研究了.现在实验中得到的信息还不能由理论完全解释和处理.如果能够得到近场中光传播的解析解和模拟结果,就可以分析更多的由近场光学图像提供给我们的微区信息.

其三,可以研究生物系统的动态过程,尤其是在成像速度得到大幅度提升之后.

要开拓 SNOM 在生命科学领域的应用,除了以上提及的 3 点以外,还需要发展完善液态中的成像技术,寻求更灵敏控制探针的途径.为了使 SNOM 最终成为细胞生物学、遗传生物学等生命科学工作者的常备工具,还要增强系统的易用性和稳定性.对于 SNOM 的发展来说,还可以结合光钳技术,同步实现微操纵和微成像.作为仅仅诞生不到 20 年的一门新兴学科技术,近场光学显微术应用在生物研究领域前途无量,有很多富有挑战性的工作等待我们去完成.

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 朱星.物理,1996,25:458—465  
ZHU Xing. Physics,1996,25:458—465(in Chinese)
- [ 2 ] Betzig Eric, Chichester Robert J. Science,1993,262:1422—1425
- [ 3 ] McCulloch S, Uttamchandani D. IEE Proc. Optoelectron, 1997,144:162—167
- [ 4 ] Xie X Sunney, Dunn Robert C. Science,1994,265:361—364
- [ 5 ] Dunn Robert C, Holtom Gary R, Mets Laurens *et al.* J. Phys. Chem.,1994,98:3094—3098
- [ 6 ] Hwang Jeesong, Gheber Levi A, Margolis Leonid, *et al.* Biophys. J.,1998,74:2184—2190
- [ 7 ] Gheber Levi A, Hwang Jeesong, Edidin Michael. Applied Optics,1998,37:3574—3581
- [ 8 ] Pilevar Saeed, Atia Walid A, Davis Christopher C. Ultramicroscopy,1995,61:233—236
- [ 9 ] Enderie Th, Ha T, Chemla D S *et al.* Ultramicroscopy,1998,71:303—309
- [ 10 ] Muramatsu Hiroshi, Chiba Norio, Homma Katsunori *et al.* Appl. Phys. Lett.,1995,66:3245—3247
- [ 11 ] Maheswari R Uma, Tsumi H, Katayama Y *et al.* Optics Communications,1995,120:325—334
- [ 12 ] Moers M H P, Ruiter A G T, Jalocha A *et al.* Ultramicroscopy,1995,61:279—283
- [ 13 ] Garcia-Parajo M F, Veerman J-A, Ruiter A G T *et al.* Ultramicroscopy,1998,71:311—319
- [ 14 ] Nily Ben Ami, Anna Radko, Udi Ben Ami *et al.* Ultramicroscopy,1998,71:321—325
- [ 15 ] Naya M, Micheletto R, Mononobe S *et al.* Applied Optics, 1997,36:1681—1683
- [ 16 ] Talley Chad E, Lee M Annie, Dunn Robert C, Appl. Phys. Lett.,1998,72:2954—2956

(上接第 6 页)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Julliere M. Phys. Lett.,1975,A54:225—226
- [ 2 ] Miyazaki T, Tezuka N. J. Magn. Magn. Mat.,1995,139:L231—L234
- [ 3 ] Moodera J S, Kinder L R, Wong T M *et al.* Phys. Rev. Lett., 1995,74:3273—3276
- [ 4 ] 卢正启.物理,1998,27:373—376  
LU Zheng Qi. Physics,1998,27:373—376(in Chinese)
- [ 5 ] Moodera J S, Gallagher E F, Robinson K *et al.* Appl. Phys. Lett.,1997,70:3050—3052