

扫描离子电导显微镜的研制与实现

李 鹏^{1,2}, 张常麟^{1,2}, 王文学¹, 刘连庆¹

(1. 中国科学院沈阳自动化研究所 机器人学国家重点实验室, 辽宁 沈阳 110016)

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 在微纳米尺度上对活细胞高分辨率成像对生命科学研究具有重要的意义, 其将有助于再现正在发生的生命过程、检测细胞对外界刺激做出的响应, 甚至观测某些蛋白簇在细胞膜表面的运动。然而直到今天, 仍然没有很好的实现上述目标。扫描离子电导显微镜(SICM)由于其真正的非接触、高分辨、无损独特成像方式, 规避了扫描过程中探针与样品表面发生力的接触, 得到越来越多的关注和广泛的应用。从系统的角度阐述自制 SICM 系统的设计、硬件集成及跳跃模式扫描算法的实现, 并通过与聚二甲基硅氧烷(PDMS)栅格成像以及原子力显微镜(AFM)成像结果的对比, 验证了系统功能的正确性和有效性; 最后开展了生理环境下活体细胞的原位扫描成像实验, 初步获取了活体神经细胞轴突结构的三维形貌图像。SICM 的成功搭建, 将为人们深入了解生理条件下活体生物样品表面微观结构与功能机理等提供有效的研究方法手段。

关键词: 扫描离子电导显微镜; 活细胞无损成像; 跳跃模式

中图分类号: TP23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-2276(2014)06-1894-05

Development and implementation of scanning ion conductance microscope

Li Peng^{1,2}, Zhang Changlin^{1,2}, Wang Wenxue¹, Liu Lianqing¹

(1. State Key Laboratory of Robotics, Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: High-resolution imaging of living cell at the micro-/nano-scale is important for life science research. It may help to observe biological activities of cells, and to detect cell responses to external stimuli and even movements of some protein molecules in cell membranes. However, there have not been effective methods to realize such objectives yet. Scanning ion conductance microscope (SICM) has been widely applied in many fields and is receiving increasing attention due to its non-contact, force-free, and high-resolution imaging features. Herein, a design of SICM, including hardware integration and scanning algorithms, was introduced from the point of view of system firstly; then the feasibility and effectiveness of the system was evaluated through comparison of PDMS gratings measurements by SICM and AFM;

收稿日期: 2013-10-12; 修订日期: 2013-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(61175103); 中国科学院科研装备研制项目(YZ201245); 中国科学院与国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划

作者简介: 李鹏(1987-), 男, 博士生, 主要从事微纳米机器人学、单细胞操作以及多探针系统协同方面的研究。Email: lipeng1987@sia.cn

导师简介: 刘连庆(1980-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事纳米机器人学、智能控制、微纳生物传感技术方面的研究。

Email: lqliu@sia.cn

finally, in situ experiments of living-cell imaging in physiological environment had been carried out, and the topography of living neuro-2A cell had been successfully obtained. The well-established scanning ion conductance microscope will provide an effective tool for investigating functional mechanism and micro-structure on the surface of living biological samples.

Key words: scanning ion conductance microscope; non-destructive living cell imaging; hopping mode

0 引言

扫描探针显微镜与生物技术的结合开辟了微米尺度下观测生物学的新纪元。其中原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, AFM) 的出现更是为人们在观测活体细胞表面微观形貌提供了一种可行性。但 AFM 检测依赖于针尖与样品间的相互作用力,因此在扫描过程中势必会有针尖-样品间作用力的存在,这对柔软活细胞而言,针尖垂直方向作用力会引起细胞表面细微结构发生形变,以致扫描的图像不能真实反应其原有形貌,而横向作用力则很容易损坏细胞,并且探针针尖与细胞表面存在粘附作用,严重影响成像分辨率。扫描离子电导显微镜 (Scanning Ion Conductance Microscope, SICM) 则跟其他扫描探针显微镜不同,检测的是超微玻璃管探针与样品间的电流变化,是一种扫描时与样品真正非接触,并能在生理条件下对活体生物样品进行高分辨率成像的扫描探针显微镜。该项技术在 1989 年由 Hansma 小组^[1]首先提出,再由 Korchev 小组^[2-3]在此基础上加以改进,并于 1997 年第一次成功应用于活细胞高分辨成像,从此该项技术得到了迅猛发展,并在生物^[4-6]、化学^[7]、材料^[8]等多个领域均得到了广泛应用。SICM 采用一个尖端内半径为数十纳米到数百纳米的超微中空玻璃管作为扫描探针。两个 Ag/AgCl 电极一根置于内装有电解质溶液的超微玻璃管探针中,另一端置于含有电解质溶液的样品皿中,两个电极在外加偏置电压驱使下产生回路电流。当超微玻璃管探针靠近样品表面时(一般为玻璃管尖端内半径左右),随着距离的靠近,由于容许离子流过的空间缩减,回路电流会急剧减少。因此依据这一距离/电流曲线关系,实时监测回路电流的变化量,并通过负反馈控制量上下调节玻璃管探针使电流维持在设定恒定值,此时探针的位置可用来表征样品在该点的高度。逐行对样品扫描则可得到整个样品的三维形貌图像。

早期的 SICM 采用连续扫描距离控制模式,该模式下扫描细胞时,超微玻璃管探针往往无法快速跟随细胞表面某些急剧的垂直高度起伏,而很容易与复杂细胞表面突变(如神经细胞的轴突、内耳细胞的纤毛等)发生碰撞而导致成像失败。为了解决这个问题,科学家引入了一种新型的距离控制方式-跳跃模式^[9]。该模式类似于 AFM 中的力谱图扫描模式,样品在逐行扫描过程中不再是均匀运动,而是将每行平均间隔为多个扫描点,每个点扫描结束后快速跳跃到下一个点。在每个扫描点,玻璃管探针从数微米甚至十几微米的预先设定安全距离远处向样品逼近,控制器实时监测回路电流变化,当到达设定值后记录下该点高度值,接着快速返回至安全距离,最后大步运动至下一个点,如此循环,直至扫描完整个样品。在跳跃模式中玻璃管探针上下大幅度的跳动,能很容易地越过垂直高度较大的障碍,这极大地克服了传统连续扫描方式的不足,并能有效地对极其复杂的细胞表面进行纳米尺度下的高分辨率长时间无损观测^[10]。

文中将详细讲述自制 SICM 系统的结构设计、硬件集成及跳跃模式扫描算法的实现,并重点对集成后系统进行了全面的功能性验证。实验结果表明该系统性能优良,数据准确可靠,将为非生物样品或活细胞等生物样品成像提供一项有效的显微观测手段。

1 SICM 系统

SICM 系统主要由扫描头、上位机以及控制机组成,结构框图见图 1。扫描头是整个系统的核心部件,负责外加钳制电压的施加、微弱回路电流的检测,微动平台以及纳米平台的执行等。本系统中纳米级别的运动由承载样品的三维纳米平台实现,而微动平台可带动玻璃管探针亚微米级别快速逼近与远离样品表面。流经玻璃管探针的回路电流经过膜片钳放大器电流放大,输出给控制机。控制机负责整个负反馈控制回路的构建,以某一给定电流作为目标

控制量,输出位移控制命令控制纳米平台运动。上位机提供良好的人机交互界面,不仅可实时显示扫描图像,还能修改、设置参数和传递命令给控制机。

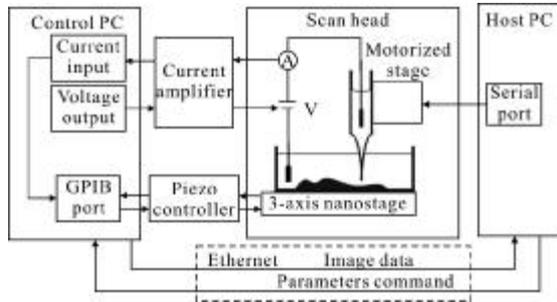


图 1 SICM 结构框图

Fig.1 Block diagram of SICM structure

2 距离控制算法

文中采用的 SICM 系统距离控制方式为跳跃模式,算法示意图 2(a),探针相对于样品上下左右运动,而实际上自制 SICM 系统扫描过程中则是探针保持不动,样品随纳米平台三维方向运动。图 2(b)表示实验过程测得的回路电流波形跟对应 Z 轴压电陶瓷的示意位移。从图 2(b)可看出每个扫描周期的后半程回路电流稳定在某个值,这说明了控制算法良好,达到了预期目标。跳跃模式中一个扫描周期具体步骤如下:

- (1) 设定安全位置,该位置时测出参考电流,并设定电流控制点,一般为下降参考电流的 1%~3%;
- (2) 纳米平台控制样品 Z 轴方向均匀向上移动,直到检测电流有所减少;
- (3) 数次 PI 控制,微调纳米平台 Z 轴位移使电流稳定在控制点,记录此时 Z 轴位移;
- (4) Z 轴收缩回至安全位置;
- (5) 移动到下一个

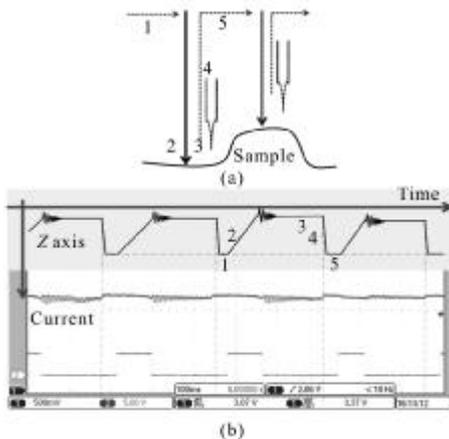


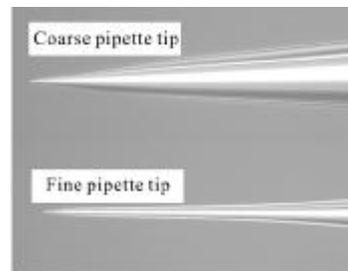
图 2 跳跃模式

Fig.2 Hopping mode

点,重复以上步骤。

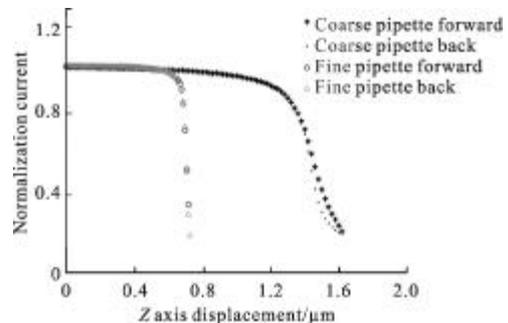
3 探针-样品间距离/电流关系

通过观测玻璃管探针对干净样品皿基底逼近过程中的回路电流变化,可用来研究 SICM 探针-样品间距离/曲线关系。实验中发现尺寸不同的玻璃管探针在接近样品过程中回路相对电流强度(回路电流/参考电流)与 Z 轴压电陶瓷位移有不同的曲线关系,见图 3。Z 轴压电陶瓷间接表示了玻璃管探针-样品间距离,随着 Z 轴压电陶瓷的伸长,玻璃管探针-样品间距离变小。从图 3 可以看出,当玻璃管探针沿 Z 轴逐渐接近样品但距离样品较远时,回路电流减小缓慢,仍保持在参考电流附近;当探针快接近样品时,一般为距离玻璃管尖端内半径左右^[2],回路电流急剧减少。并且玻璃管探针尖端内半径越小,回路电流变化越陡峭。这表明扫描时采用的玻璃管探针尖端尺寸越小,对样品高度变化的检测灵敏度就越高,扫描分辨率也就越高。目前 Korchev 小组^[10]利用内半径为 7 nm 的石英玻璃管探针成功观测到活公牛精子细胞表面蛋白簇的动态变化,水平方向达到 3~6 nm 的



(a) 尺寸不同玻璃管探针尖端光学图像比较

(a) CCD images of two nanopipettes



(b) 尺寸不同两玻璃管探针时 Z 轴压电陶瓷位移/相对电流曲线比较

(b) Experimental approach curves for two nanopipettes

图 3 玻璃管探针-样品间距离/电流关系实验

Fig.3 Comparison between two nanopipettes of different inner tip radii

分辨率。文中后续提到的扫描成像所用到的玻璃管探针均为图 3 中细玻璃管探针情形,为程控激光拉制仪(P2000/G, Sutter Instrument 公司)同一程序控制完成,尖端内半径均为 150 nm 左右。

4 实验及其性能测试

笔者用研制的 SICM 进行了一系列扫描成像实验。系统实物图见图 4。纳米平台(型号 E710.3CD, Physik Instrument 公司)承载样品可三个方向纳米级别运动,XYZ 扫描范围为 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$,分辨率为 0.1 nm。微动平台(9062-XYZ-PPP, New Focus 公司)可实现亚微米级别运动精度,尤其应用于控制扫描探针对于样品表面的初始快速逼近。玻璃管探针中的微弱电流经过膜片钳放大器(EPC 800 USB, HEKA 公司)放大,为控制机进行距离控制提供有效的负反馈控制量。

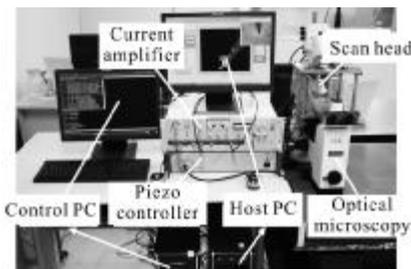


图 4 自主研发 SICM 系统平台

Fig.4 Platform of scanning ion conductance microscope (SICM)

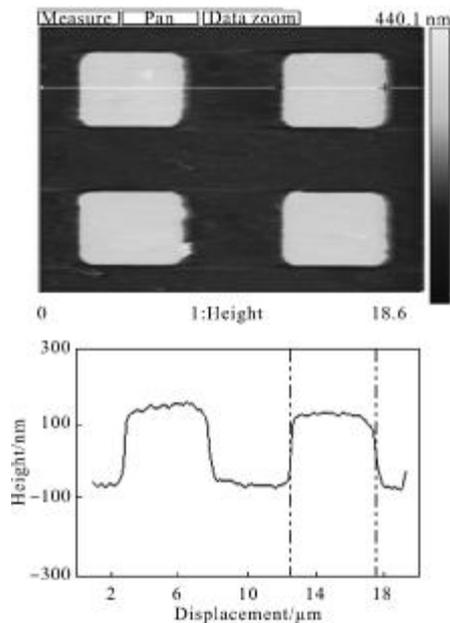
4.1 PDMS 栅格 SICM 与 AFM 扫描实验

以宽 $5\ \mu\text{m}$, 深 200 nm 的 AFM 标定用标准栅格(P/N 498-000-026, Digital Instruments 公司)作为母模,制作聚二甲基硅氧烷(PDMS)栅格样品。PDMS 样品制作过程如下:

- (1) 将硅材料标准栅格放入 75% 的酒精溶液中超声清洗 20 min;
- (2) 取出标准栅格,氮气吹干后置于 $\Phi 35\ \text{mm}$ 培养皿中,正面朝上,然后将 PDMS (Sylgard 184, Dow Corning 公司)主剂与硬化剂 10:1 搅拌均匀^[12]后倒入硅材料栅格表面,超出栅格表面 10 mm 为最佳;
- (3) 将装有标准栅格与 PDMS 的培养皿置入真空干燥箱中,抽真空 20 min,使得混合液中无气泡;
- (4) 置于加热板(PC-600, Corning 公司)上方 70°C 烘焙 4-5 h;
- (5) 最后将固化后的 PDMS 层从硅材料标准栅格上撕下,此时贴近硅

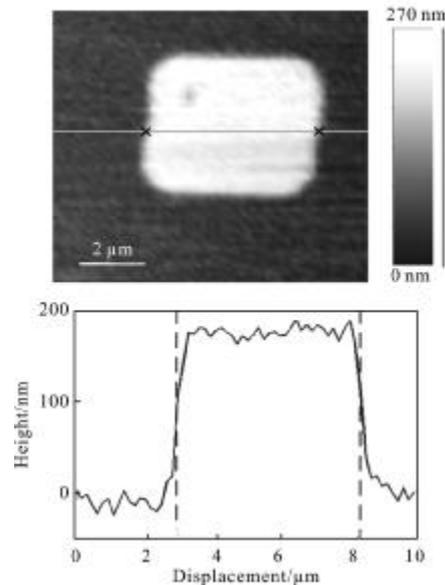
栅格的 PDMS 面将印记上与栅格互补的精细结构。

对 PDMS 样品分别用 AFM(Dimension 3100, Veeco 公司)与 SICM 扫描成像,实验结果见图 5。AFM 图像中栅格宽 $5.0\ \mu\text{m}$, 高 200 nm,这说明 PDMS 样品能成功与硅材料栅格分离,并且制作精良。SICM 扫描结果为宽 $5.2\ \mu\text{m}$, 高约 190 nm,这与 AFM 得到的实验结果接近,相对误差在 5% 以内。这与实验时所用玻璃管管尺



(a) AFM 扫描图像与轮廓线

(a) AFM image and section profile



(b) SICM 扫描图像与轮廓线

(b) SICM image and section profile

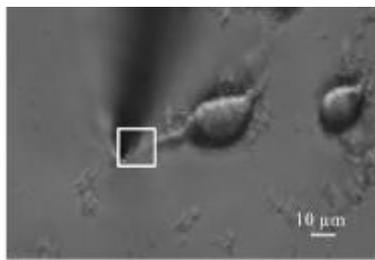
图 5 PDMS 栅格扫描结果

Fig.5 Experimental results of PDMS gratings

寸较大(尖端内半径约 150 nm)相关,减少玻璃管尺寸将有助于提高 SICM 扫描分辨率。

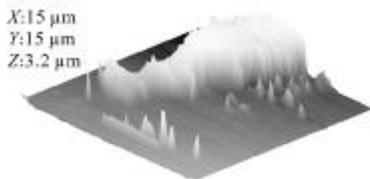
4.2 neuro-2A 活体细胞轴突 SICM 扫描实验

笔者在搭建的系统上对培养 2-3 天后的神经瘤细胞(neuro-2A,上海复祥生物科技有限公司)在生理液态环境下进行范围为 $15\ \mu\text{m}\times 15\ \mu\text{m}$ 的 SICM 扫描成像,如图 6 所示,可以清楚看到神经细胞轴突表面细微结构。借助光学图像可控制超微玻璃管探针选择感兴趣的区域进行扫描,光学图像见图 6(a)所示。对图 6(a)中白色框内区域进行 SICM 扫描成像,扫描结果见图 6(b)。扫描得到的三维形貌图像展示了跳跃模式下,探针追随到从样品皿基底到细胞突起表面的急剧变化。



(a) 光学 CCD 图像

(a) CCD image



(b) SICM 三维形貌图像

(b) Topography of living cell by SICM

图 6 Neuro-2A 活体细胞轴突 SICM 扫描成像

Fig.6 SICM image of living neuro-2A cell

5 结论

近年来,活体细胞的高分辨率成像由于其重要的生物学意义一直是无数科研工作者努力的方向,该研究在自制的 SICM 系统基础上对其做了初步的尝试。文中详细讲述了 SICM 系统的搭建,并对该系统做了全面的功能性验证。首先获取了玻璃管探针-样品间距离/电流实验曲线,为非接触高分辨 SICM 扫描成像奠定了基础;之后对 PDMS 栅格样品表面进行形貌扫描成像,与 AFM 扫描图像的比较验证了该系统扫描结果的准确性;最后在生理环境下成功获得活体

神经细胞轴突结构的三维形貌图像。成功搭建的 SICM 系统不局限于形貌扫描应用,还可扩展到微量定点注射、精准膜片钳等领域,将成为生物领域相关基础研究方面强大有力的科研工具。

参考文献:

- [1] Hansma P K, Drake B, Marti O, et al. The scanning ion-conductance microscope [J]. *Science*, 1989, 243(4891): 641-643.
- [2] Korchev Y E, Bashford C L, Milovanovic M, et al. Scanning ion conductance microscopy of living cells [J]. *Biophys J*, 1997, 73(2): 653-658.
- [3] Korchev Y E, Milovanovic M, Bashford C L, et al. Specialized scanning ion-conductance microscope for imaging of living cells [J]. *Journal of Microscopy*, 1997, 188: 17-23.
- [4] Korchev Y E, Negulyaev Y A, Edwards C R W, et al. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(9): 616-619.
- [5] Gorelik J, Gu Y C, Spohr H A, et al. Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a smart patch-clamp system [J]. *Biophys J*, 2002, 83(6): 3296-3303.
- [6] Shevchuk A I, Novak P, Takahashi Y, et al. Realizing the biological and biomedical potential of nanoscale imaging using a pipette probe [J]. *Nanomedicine*, 2011, 6(3): 565-575.
- [7] Ji T R, Liang Z W, Zhu X Y, et al. Probing the structure of a water/nitrobenzene interface by scanning ion conductance microscopy [J]. *Chem Sci*, 2011, 2(8): 1523-1529.
- [8] Laslau C, Williams D E, Travas-Sejdic J. The application of nanopipettes to conducting polymer fabrication, imaging and electrochemical characterization [J]. *Prog Polym Sci*, 2012, 37(9): 1177-1191.
- [9] Novak P, Li C, Shevchuk A I, et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(4): 279-281.
- [10] Liu Xiao, Yang Xi, Zhang Xiaofan, et al. Hopping probe scanning ion Conductance microscopy and its applications to topological imaging of live neuronal cells [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2010, 27(6): 1365-1369. (in Chinese)
- [11] Shevchuk A I, Frolenkov G I, Sanchez D, et al. Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy [J]. *Angewandte Chemie*, 2006, 118(14): 2270-2274.
- [12] Shi Lifang, Ye Yutang, Deng Qiling, et al. Method to fabricate artificial compound eye [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2013, 42(9): 2462-2466. (in Chinese)