

原子力显微镜在植物细胞壁力学研究中的方法及应用

覃思颖¹, 张禾²

(1. 北京大学 生命科学学院, 北京 100871; 2. 北京大学 现代农学院, 北京 100871)

摘要: 原子力显微镜技术是生物力学领域的重要工具与表征手段, 可获得生物样品的原位力学信息与表面拓扑结构。针对植物组织样品形态结构复杂、原子力实验流程普适性差等问题, 以主要模式植物拟南芥、烟草、杨树等材料为例, 从样品制作到上机扫描等全过程进行优化与改进, 建立了一套完整的植物高分辨原子力显微技术方法, 能够检测不同种类、不同组织、不同尺度的植物样品, 获得其生理状态下的原位高分辨原子力数据, 包括样品表面结构信息以及杨氏模量信息, 可在多种植物组织的原子力测试中推广应用。

关键词: 原子力; 植物; 细胞壁; 生物力学; 高分辨

中图分类号: Q66 **文献标识码:** B

Methods and Applications of Atomic Force Microscopy in Plant Cell Wall Mechanics

QIN Siying¹, ZHANG He²

(1. School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2. School of Advanced
Agricultural Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Atomic force microscopy (AFM) is an important tool and characterization method in biomechanics, which can obtain in situ mechanical information and surface topology of biological samples. In response to the complexity of plant morphological structure in tissue samples and the lack of a universal atomic force experimental process, optimization and improvement of the entire process have been made from the sample preparation and scanning processes of plant samples. A complete plant high-resolution atomic force microscopy method has been established to obtain in situ AFM data for different plant samples under physiological conditions, including information of topology and mechanics. This method can be widely applied in AFM experiments of various plant tissues.

Keywords: AFM; Plant; Cell wall; Biomechanics; High-resolution

1 背景

原子力显微镜技术是生物力学领域的重要研究手段,可在生理状态下获得纳米尺度的形貌特征及力学特性。生物型 AFM 主要分为两大功能模块,即力学检测与成像系统,其原理是应用压电陶瓷驱动探针以悬臂上的针尖接触样品,收集样品表面不同点位的力曲线,计算出样品表面的机械性能及相关参数,如拓扑结构、杨氏模量、弹性及粘弹性等^[1],最终得到具有物理特征的样品形貌 3D 重构模型。同时辅助以成像系统,可精准定位目标区域,提高精度与可重复性。

生物体的生长发育本质上是一系列力学过程,对这些力学过程的研究极大地推进了人类对生命现象的理解并衍生出多种交叉学科。生物材料的力学特性影响其功能,这在植物中最为明显,其中最显著的特征是植物细胞壁的存在,这是一层厚度在 0.1 到几微米之间的结构,将每个细胞与其相邻细胞连接起来。研究植物细胞壁的力学特性是了解植物细胞、组织和器官如何生长和获得对其各自功能至关重要的形状的关键^[2,3]。

自 1986 年 AFM 技术诞生以来^[4],经过几十年的发展才更多地应用到植物组织样品中,但其中仍然存在着很多制约因素^[5]。例如,植物样品的尺度从微米到厘米,跨度范围大,当前尚无通用的方法进行检测。此外,由于植物细胞壁及膨压的存在,植物样品的表面起伏大,会引起针尖跟踪表面不稳定,且容易超出原子力检测的 Z 轴量程,导致扫描范围小,速度慢,测试时间长,测试过程不稳定,容易撞针,难以获得完整的数据等一系列难题。适用于植物的高分辨 AFM 分析方法的建立,可帮助揭示植物生长调控中多种重要的力学过程,推动包括植物学在内的生物物理学、生物工程学及仿生材料学等新兴交叉学科发展。

2 实验方法

原子力植物样品的制作需要将样品固定在载玻片上,然后滴加成像溶液进行上机成像(图 1)。植物样品的组织差异性大,尺度跨度大,表面起伏大,因此每一种类型的植物样品都需要摸索合适的制样方法。微米级别的植物样品,需要在体视镜下操作粘附于载玻片上,操作难度较大,但是上机成像时候的样品起伏不大,扫描过程不易出现问题;厘米级别的植物样品,可直接裁剪后粘贴在载玻片上,操作难度较小,但样品起伏较大,扫描过程容易出现。本研究经过长时间的摸索与优化不同类型的植物样品的原子力制样与扫描方法,最

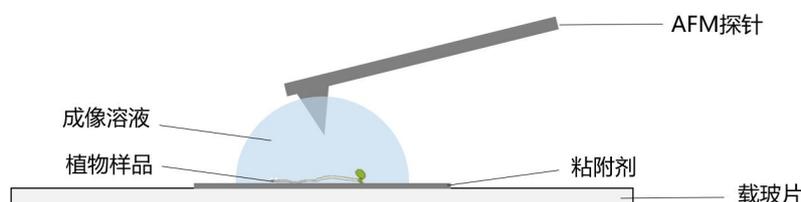


图 1 原子力植物样品制样示意图

终实现不同植物样品原子力数据的成像与采集。

2.1 实验仪器

本实验所使用的原子力设备为 Bruker BioScope Resolve, 搭建在 Nikon ECLIPSE Ti 倒置显微镜上以辅助样品定位。

2.2 制样方法

1) 花粉粒（微米级）

在载玻片上涂一层速干指甲油，将花朵倒放在上方用镊子轻敲花瓣，将花粉直接撒落于速干指甲油薄层上，待干后上机在空气下测试。

2) 花粉管（微米级）

将未萌发的花粉置于铺有固体培养基薄层（含琼脂）的载玻片上滴加萌发培养液进行萌发，2 小时后萌发出的花粉管则直接贴附琼脂培养基上生长，用培养基漂洗三次后，上机测试。

3) 下胚轴（毫米级）

使用 0.5 M 甘露醇溶液浸泡样品半小时，使其质壁分离以消除膨压对样品自身力学性质的影响。随后利用速干指甲油将植物样品固定在载玻片上（图 2 左），再滴加成像溶液保持样品生理状态进行上机（图 2 右）。



图 2 拟南芥下胚轴原子力制样滴加成像溶液前（左）与后（右）

4) 叶片、花瓣（毫米及厘米级）

叶片和花瓣有一定的生理曲度，如果整片粘在载玻片上容易粘不牢，可用剪刀或刀片将叶片或花瓣裁成约 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ ，再进行粘贴。叶片具有表皮毛，会严重影响检测的稳定性，可使用双面胶轻贴于叶片待测面的另一面，快速撕下清除表皮毛，然后再进行裁剪，尽量避开待测面的表皮毛，然后用速干指甲油固定后上机检测。如果样品表面起伏太大，或者想要避免细胞膨压的影响，可使用 0.5 M 甘露醇溶液浸泡样品处理半小时。

5) 幼嫩茎（厘米级）

取杨树幼嫩茎进行徒手切片，将所得切片放入 0.5 M 甘露醇溶液浸泡处理，清除切片产生的碎片并提供液体环境。选取半透明切片，在无尘纸上稍吸干后，用速干指甲油粘贴在载玻片上，上机检测。

2.3 探针选择

根据样品的刚度和实验环境，选择合适的探针。本实验中，花粉粒样品在空气中成像，所使用的探针型号为 Bruker RTESP-300，弹性系数 40 N/m，针尖半径 8 nm。其余的植物样品均为液下成像，所使用的原子力探针型号为 Bruker ScanAsyst-Fluid，弹性系数 0.7 N/m，针尖半径 20 nm。

2.4 扫描方法

将探针安装在探针夹后，采用 Thermo tune 的方法在载玻片上校准探针，获得探针的灵敏度（单位为 nm/V）与弹性系数（单位为 N/m）。需要注意的是，在空气中检测样品则需要使用空气探针夹并在空气下进行校针，在液下检测样品则需要使用液下探针夹并在相同的溶液下较针。测试中途如果探针被撞歪或者调整了激光光斑位置则需要重新校准。

将样品载玻片放置于载物台上，安装好扫描头，通过调节倒置显微镜的焦平面判断探针与样品之间的距离，先手动降针至距离样品约 500um 的位置，然后将探针位置与样品待测位置对准。以液下扫描为例，在 Nanoscope9.4 软件中设置 Engage settings (Peak Force Engage Amplitude 150nm)，Scan 参数中的 ScanAsyst Auto Control 选择 Individual，其中 Gain、Z limit 选择 On，Setpoint、Scan Rate 选择 Off。另外参数设置为 Scan Size 10 nm、Scan Rate 0.2-0.5 Hz，Samples/Line 64，Line 64，Peak Force Setpoint 2-10 nN（根据样品情况），Peak Force Amplitude 150 nm，Peak Force Freq 1 kHz，Sample Poisson's Ratio 0.5。点击 Engage 进行下针。在倒置显微镜相机成像中可看到探针在靠近样品。探针接触到样品表面后，可看到良好的力曲线。逐步把 Scan Size 设定到合适的大小（如 40 x 40 μm ），把 Samples/Line 与 Line 设置到 256，开始扫描，获得原子力数据。扫描过程中时刻关注力曲线以及 Z 量程范围，如果 Z 量程超出范围，需要调整扫描位置以找到合适的区域，或者缩小扫描范围以减少 Z 量程。

3 结果与讨论

3.1 拟南芥花粉粒

花粉粒通过透明指甲油可以很好的固定在基底上，如果滴加溶液在花粉粒上，容易在花粉粒周围产生气泡，影响检测。另外，花粉粒外壁的孢粉素较硬，需要用较硬的探针来进行检测，因此花粉粒的原子力扫描方案是采用较硬的探针在空气下扫描。图 3 为花粉粒的杨

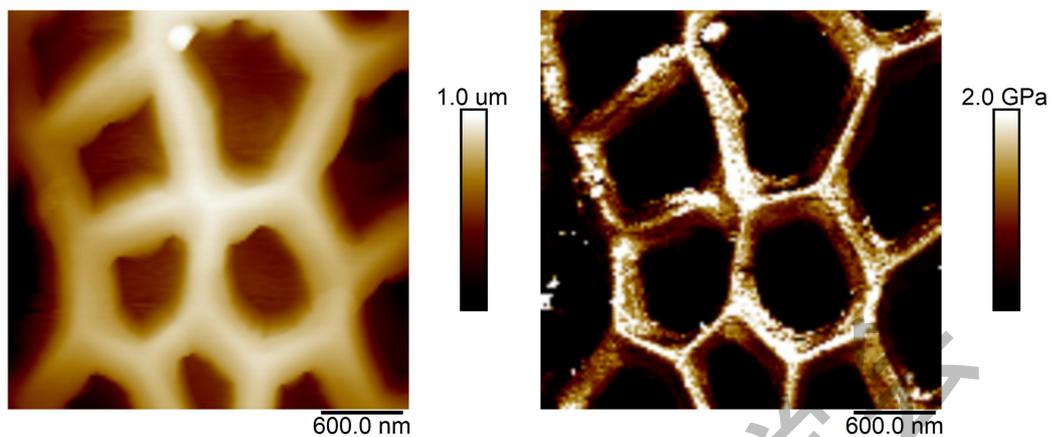


图 3 拟南芥花粉粒的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

氏模量图，扫描范围为 3 μm，杨氏模量范围约 1.5 GPa 左右。

3.2 烟草花粉管

在显微镜下找到合适的样品，对感兴趣的部位进行扫描，如花粉管的头部和中部。花粉管的直径约为 10 μm。图 4 为烟草花粉管的高度与杨氏模量图，扫描范围为 10 μm，花粉管

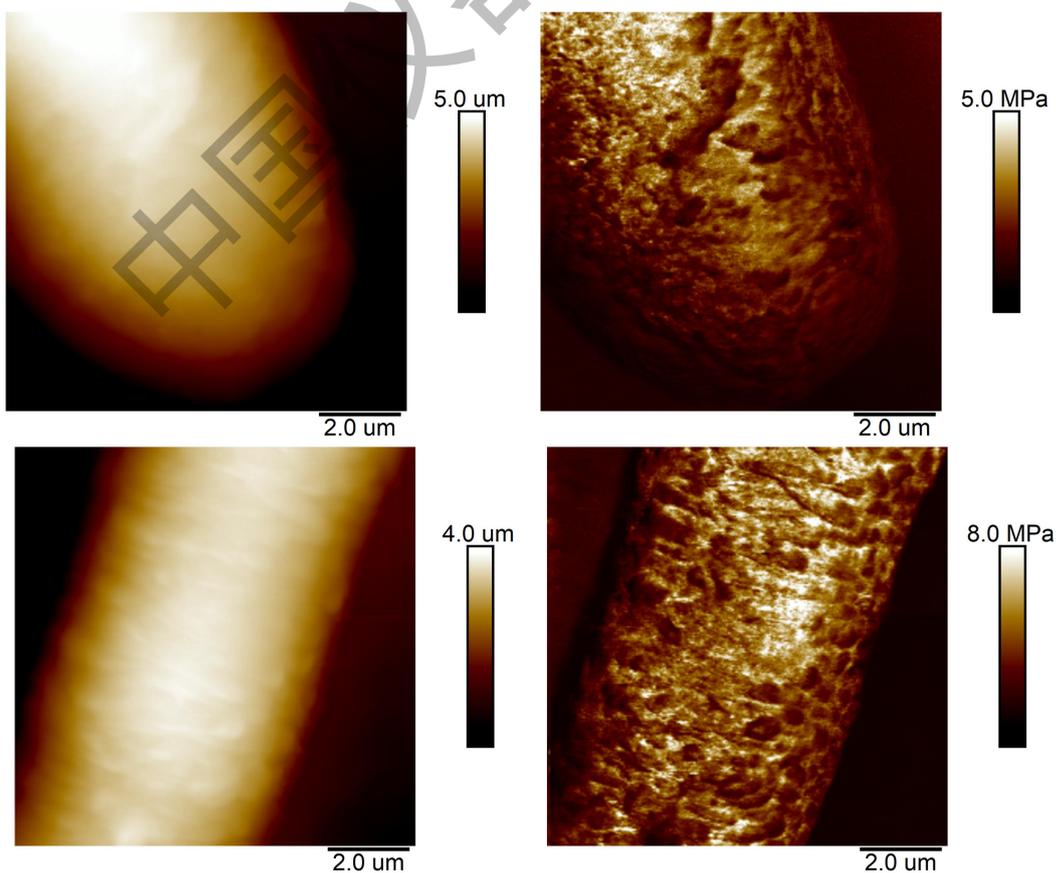


图 4 烟草花粉管头部（上）与中部（下）的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

头部的杨氏模量范围约 2 MPa 左右，中部约 4 MPa 左右。

3.3 拟南芥下胚轴

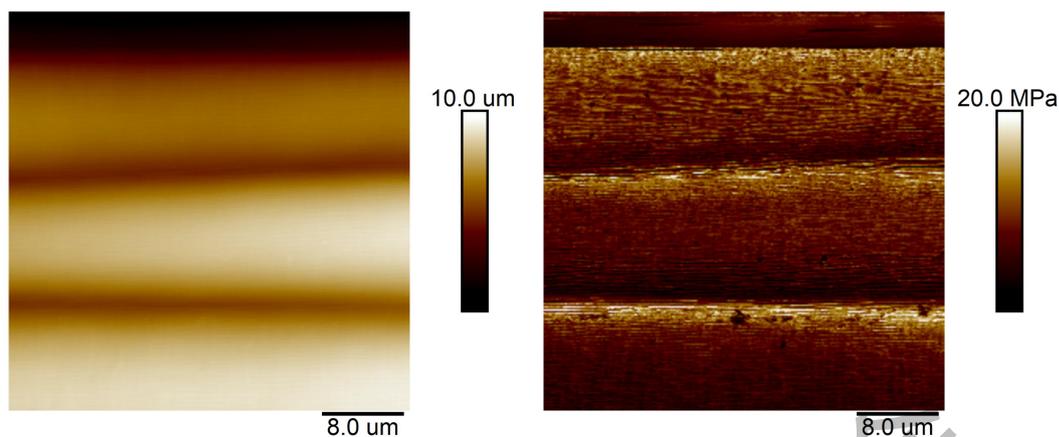


图 5 拟南芥下胚轴的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

拟南芥下胚轴的直径约为 $150\ \mu\text{m}$ ，且高度起伏较大，在扫描过程中如果扫描范围太大则会超出 Z 量程。经过测试， $40\ \times\ 40\ \mu\text{m}$ 的扫描范围可控制 Z 量程不超出范围。在选择扫描位置的时候尽量选择中间的位置。根据研究需要，可选择靠近子叶或根部或者靠中间的位置进行检测。本方法支持的研究论文中，下胚轴在受到机械触碰后，细胞壁的机械强度会得到提高，帮助植物幼苗破土而出，与植物激素乙烯的分子作用相结合，揭示植物机械触碰“记忆”形成的分子机制^[6]。图 5 为拟南芥下胚轴的高度与杨氏模量图，扫描范围为 $40\ \mu\text{m}$ ，杨氏模量范围约 10 MPa 左右。

3.4 拟南芥叶片

叶片的上下表面都有表皮毛，因此扫描的时候，可借助倒置显微镜以及 Top View 来选择没有表皮毛的位置来进行扫描。由于叶片的表皮细胞以及气孔的起伏较大，容易造成扫描不稳定，甚至撞针，因此可降低扫描速度或者减小扫描范围来保持扫描的稳定，也可以另找合适的位置重新扫描。本方法支持的研究论文中，利用原子力检测杨树叶片气孔保卫细胞的细胞壁硬度，研究转录因子 MYB156 控制气孔运动的分子调控通路，有望提高植物对于旱

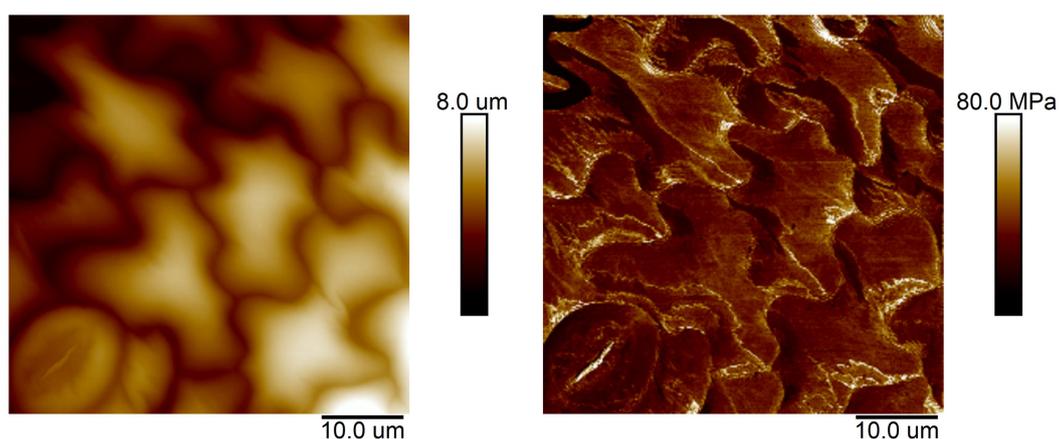


图 6 拟南芥叶片的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

的耐受能力^[7]。图 6 为拟南芥叶片的高度与杨氏模量图，扫描范围为 50 μm ，杨氏模量范围约 25 MPa 左右。

3.5 拟南芥花瓣

拟南芥花瓣的表皮细胞呈凸起状态，细胞之间有较深的缝隙，由于原子力探针的空间位阻，无法扫描到缝隙内部，因此在原子力数据中看到细胞之间的平面连接，这可能是由于表皮细胞的高度高于探针针尖的高度，表皮细胞跟悬臂相接触而阻挡了针尖下降，或者是细胞之间的缝隙太窄小，探针针尖无法插入其中而造成扫描的假象。本方法支持的研究论文中，利用原子力检测拟南芥叶片和花瓣的力学性质，揭示了 microRNA775 在控制植物细胞大小进而调控器官大小的作用机制^[8]。图 7 为拟南芥花瓣的高度与杨氏模量图，扫描范围为 20

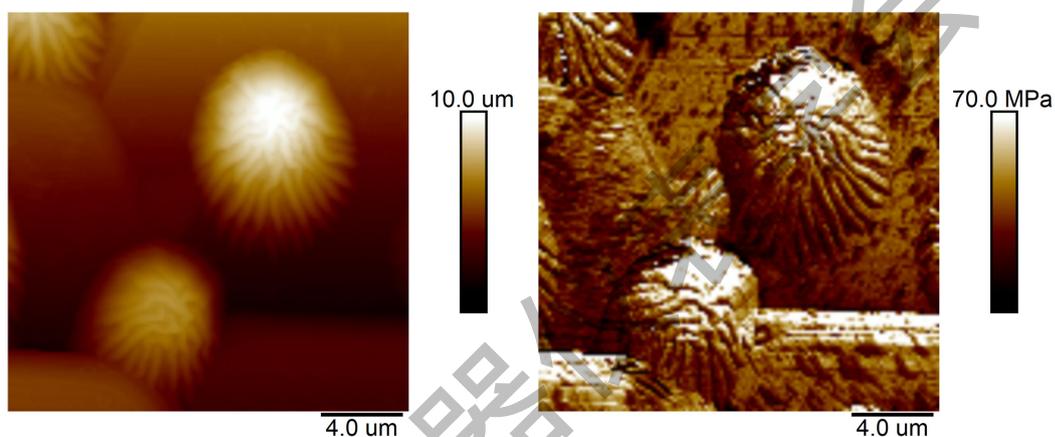


图 7 拟南芥花瓣的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

μm ，杨氏模量范围约 50 MPa 左右。

3.6 杨树幼嫩茎

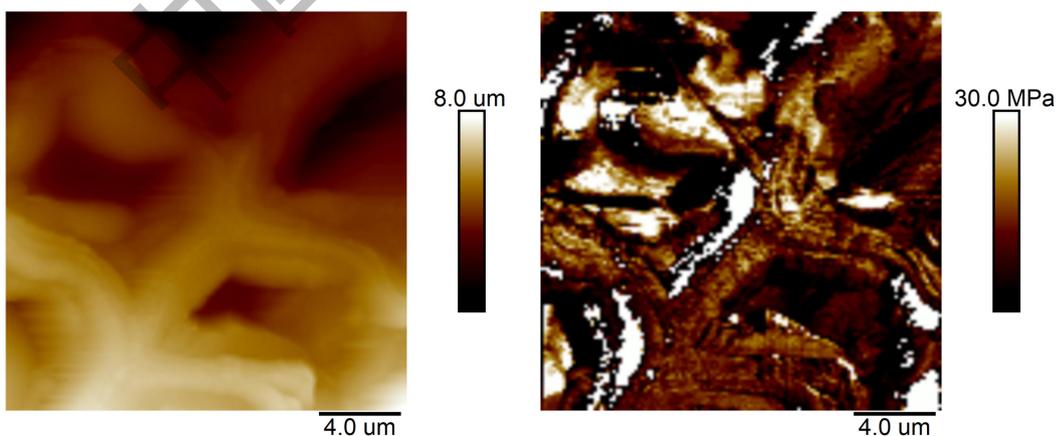


图 8 杨树幼嫩茎横切面的原子力高度图（左）与杨氏模量图（右）

对杨树幼嫩茎进行徒手切片的难度较大，对切片的平整程度要求高，需要实验人员反复练习。如果进行树脂包埋后切片，虽然平整程度很高，但是树脂包埋过程对样品的性质有影响，因此不建议进行树脂包埋。由于徒手切片后细胞受损，最好尽快上机扫描。本方法支持的研究论文中，利用原子力检测杨树幼嫩茎细胞壁的刚性，研究功能基因 PtoP4H9 促进树干纵向生长的分子生物学机制^[9]。图 8 为杨树幼嫩茎的高度与杨氏模量图，扫描范围为 20 μm ，杨氏模量范围约 20 MPa 左右。

3.7 方法讨论

AFM 技术能够在单细胞甚至亚细胞水平上提供关于活的、生长的植物样品表面结构和机械性质方面的信息。除了研究植物内在调控因素（基因、蛋白等生物组件）对生长发育的作用，还可以研究在不同外界因素，如环境刺激和激素浓度等作用下对植物细胞产生的影响。AFM 技术在植物学研究中的应用，尚存在待解决与改善的问题。在实际上机检测过程中，扫描范围广、速度快、精度高，一直是原子力成像所追求的目标，但这三者存在相互制约的关系。想增加扫描范围，扫描的速度就得相应的降低，否则扫描过程不稳定；想提高扫描精度，采样的频率就得增加，相对应的速度就会下降；想提高扫描速度，对样品表面平整度的要求会相应的提高，样品表面越平整，扫描过程越稳定，扫描速度越快。有的时候一套完整的原子力数据需要长达 40 分钟，这非常考验扫描的稳定与操作人员的经验。大部分植物组织样品的表面起伏都比较大，而扫描的垂直高度受到仪器扫描头 Z 轴量程的限制，如果样品的起伏超过 15 μm 则容易超出 Z 轴量程而导致扫描中止。扫描范围越大，扫描的垂直高度也会相应的增加，因此在上机检测的时候需要反复测试合适的扫描范围，在不超过 Z 轴量程的范围内尽可能的增加扫描范围，然后根据扫描情况来设定扫描速度与采样频率。

本套植物高分辨原子力显微镜技术方法具有广阔的应用前景和较高的科研价值，特点如下：

- 1) 适用范围广，可操作性强，推广性高：当前研究已经涵盖了植物学研究领域最为主要的几种模式作物（拟南芥、烟草和杨树），从低等到高等，从一年生到多年生。同一物种中又可针对不同细胞类型及多样化尺度要求提供个性化最优方案。未来针对不同物种植物，在经过简单的预实验探索之后，即可快速确定实验方案，获得理想的实验数据，大大简化实验周期，应用前景广泛。
- 2) 活体无损检测：样品基本保持原始生理活性，更接近真实活体状态，在样品制备过程中，无需对样品进行干燥或真空处理，也无需对样品进行包埋切片等操作，可保持样品的

生理状态，特别是不能离开溶液环境的样品如花粉管等，可直接在溶液环境下与基底进行贴附固定，防止样品干燥形变而影响实验结果。

- 3) 预处理简单，可实现高精度与高通量检测：选取适合的粘附剂固定植物组织样品将极大地提高实验的稳定性，对于表面起伏较大的组织样品通过甘露醇处理，一方面可降低表面起伏，另一方面可减少细胞膨压的影响。合适的预处理不仅能够缩短制样时间，同时在检测时还保证了探针扫描平稳，提高检测速度。

4 总结

生物力学通过生物学与力学方法的结合，对生命过程中的力学因素以及作用进行定量的研究，以了解生命系统、认识生命过程的规律。原子力显微镜技术是生物力学领域的重要工具，可对跨尺度的生命物质进行力学测量以及高分辨的三维拓扑形貌扫描，如核酸、蛋白质、单细胞、动植物组织等，可获得生物样品原位的力学信息，是光学显微镜、电子显微镜等在生命领域中常用的技术所不能提供的信息，具有不可替代性。在植物学领域，原子力的应用需求大，可在单细胞水平提供植物样品表面的结构和力学性质信息，结合分子机理可揭示植物的形态发育以及感知外界变化的作用机制。植物样品的组织差异性大，尺度跨度大，表面起伏大，无通用的原子力实验流程，且扫描过程中易失水皱缩而影响表面结构与力学信息。基于平台的原子力测试服务，对植物样品的原子力制样和扫描过程进行了优化与改进，对植物样品进行预处理如质壁分离以消除细胞膨压对测量的影响、去除表皮毛以免扫描过程撞针等，预处理后原组织直接上机，不干燥、包埋切片等以保持生理状态下的力学信息，成功建立了完整的植物高分辨原子力显微技术方法，针对不同样品筛选合适的粘附剂和粘附方法，优化成像参数获得高精度大视野的原子力数据，针对不同种类、不同组织、不同尺度的植物样品，获得其生理状态下的原位高分辨原子力数据，包括样品表面结构信息以及杨氏模量信息，可在各种植物组织的原子力测试中推广应用。

参考文献

- [1] Dufrêne Y F, Ando T, Garcia R, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology[J]. Nature Nanotechnology, 2017, 12(4): 295 - 307.
- [2] Ding S-Y, Liu Y-S, Zeng Y, et al. How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility? [J]. Science, American Association for the Advancement of Science, 2012, 338(6110): 1055 - 1060.

- [3] Zhang B, Gao Y, Zhang L, et al. The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 251 - 272.
- [4] Binnig G, Quate C F, Gerber Ch. Atomic Force Microscope[J]. *Physical Review Letters*, 1986, 56(9): 930 - 933.
- [5] 祖元刚, 张宇亮, 刘志国, 等. 原子力显微镜在植物学研究中的应用[J]. *植物学通报*, 2006(6): 708 - 717.
- [6] Wu Q, Li Y, Lyu M, et al. Touch-induced seedling morphological changes are determined by ethylene-regulated pectin degradation[J]. *Science Advances*, 2020, 6(48): eabc9294.
- [7] Zheng L, Chen Y, Ding L, et al. The transcription factor MYB156 controls the polar stiffening of guard cell walls in poplar[J]. *The Plant Cell*, 2023: koad198.
- [8] Zhang H, Guo Z, Zhuang Y, et al. MicroRNA775 regulates intrinsic leaf size and reduces cell wall pectin levels by targeting a galactosyltransferase gene in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(3): 581 - 602.
- [9] Xiao L, Fang Y, Zhang H, et al. Natural variation in the prolyl 4-hydroxylase gene PtoP4H9 contributes to perennial stem growth in Populus[J]. *The Plant Cell*, 2023: koad212.