

不同厚度细胞薄片对 AFM 图像反差的影响*

李鑫辉¹⁾ 季彤²⁾ 孙洁林¹⁾ 张陈平²⁾ 胡钧^{1,3)**}

¹⁾上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心纳米生物学实验室, 上海 200030;

²⁾上海第二医科大学附属第九人民医院, 上海 200011;

³⁾中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

摘要 利用原子力显微镜 (AFM) 观察超薄切片的表面, 探索表面形貌与切片厚度、朝向等因素的关系以及对图像反差的影响. 选择三种不同类型的细胞, 培养后按电镜超薄切片法固定、包埋并切片后, 将不同厚度的切片区分上下表面转移到云母上, AFM 在空气中以接触模式进行观察. 结果发现, 切片表面细胞相对包埋介质的凸起与凹陷与切片本身的厚度密切相关, 并随切片厚度的不同呈现有规律的变化. 实验统计结果显示这种现象可能具有普遍性.

关键词 表面形貌, 图像反差, 超薄切片, 原子力显微镜

学科分类号 Q6-3

在生物学的发展历程中, 显微术的作用至关重要, 尤其是早期显微学领域的某些重要发现被视为具有里程碑的意义, 直接促成了细胞生物学及其相关学科的突破性发展. 通常显微图像反差直接与分辨率相关, 因此, 如何增强反差一直是显微学研究的重点之一^[1-8]. 可是某些显微图像的反差来源复杂, 有的到现在也没有完全了解, 如组织染色技术中某些染料与细胞成分相互作用并显色的过程就不甚清楚^[9], 人们在具体操作时常常凭经验进行, 较少涉及反差机制本身. 本文利用原子力显微镜 (AFM) 观察细胞切片表面, 并考察了细胞切片的不同厚度对 AFM 图像反差的影响, 并探讨细胞切片 AFM 图像的反差机制.

AFM 是在 20 世纪 80 年代发展起来的新一代显微镜^[10]. 自其诞生以来, AFM 就广泛地用于生物材料的研究, 包括 DNA、蛋白质、病毒、细胞器、细胞以及组织等等^[11-17], 研究的内容也涉及结构与功能、相互作用及其他物理、化学特性等^[18-22]. 根据 AFM 的成像原理, 其高度图像反映的是样品表面高低起伏的形貌信息. 对于组织或细胞的超薄切片, AFM 图像不仅显示了细胞的超微结构, 而且分辨率达到可以和电镜相比的水平. 如 Amako, Ushiki 和 Yamashina 等是较早开始利用 AFM 观察生物样品超薄切片的, 他们都发现切片表面的 AFM 图像显示的是有关细胞结构的信息^[23-25]. 随后 Osada 等^[26]继续在这方面努力, 并将透射电镜 (TEM) 的照片与 AFM 照片作对比, 发现两者存在一一对应的关系, 即 AFM 图像与 TEM 照片一样都反映

组织与细胞本身的结构. 近年来, Nag 和 Melling 等^[27,28]已将 AFM 图像的分辨率提高到可以与 TEM 相比拟的水平, 并且局部的精细结构更为清晰. TEM 图像的反差机制已经得到普遍认可, 人们也已掌握了不少提高生物样品反差的方法^[29,30]. 但 AFM 对生物样品超薄切片成像反差高低的研究, 很少有文献报道, 而更为基础性的问题是: 为什么切片表面高低起伏的形貌反映的是有关细胞结构的信息?

影响细胞切片 AFM 图像反差的因素很多, 可能包括以下几个方面的原因: 样品及包埋介质、切片的厚度、切片面的选择等. 本工作选择了三种不同类型的细胞, 按照常规的电镜超薄切片法包埋并切片后, 选择不同厚度的切片转移到云母表面, 然后利用 AFM 观察不同厚度切片的正反表面. 结果发现, 切片表面的高低起伏 (指细胞平均高度与周围包埋介质的高度相比, 以“凸起”和“凹陷”描述之) 与本身的厚度密切相关, 并呈现有规律的变化, 即总体随着厚度的增加, 正面的细胞高度会发生凹陷 - 凸起 - 凹陷的变化, 并在 60~80 nm 的厚度范围内, 凸起最显著, 反面的细胞虽然一直表现为凹陷, 但在上述范围内凹陷程度最低. 当切片厚度超过 120 nm 时, 正反面的凹陷程度随厚度增加有增大的趋势. 实验中选择三种细胞, 每种样品数超过 20, 都表现有相同的趋势, 反映了这种现

*国家自然科学基金资助项目 (30300389), 上海交通大学 - 上海第二医科大学合作研究基金资助.

** 通讯联系人.

Tel: 021-64077360, Fax: 021-64472577

E-mail: jhu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-12-31, 接受日期: 2005-02-28

象可能具有一定的普遍性. 样品表面的高低差异决定了图像的反差. 切片正反表面细胞整体所表现的凸起和凹陷取决于切片的厚度. 本工作为选择合适厚度的细胞切片开展 AFM 高分辨成像及操纵研究提供依据, 并且有助于研究细胞超薄切片 AFM 图像的反差机制, 同时可以此为基础进一步在纳米尺度研究生物样品超薄切片技术中刀与包埋块相互作用的力学问题.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人口腔舌鳞癌细胞系——Tca8113 由上海第二医科大学附属第九人民医院提供. 细胞维持在含有 10% (体积比) 胎牛血清 (PAA, Gibco/BRL) 的 RPMI1640 培养液中, 置 37°C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养. 平均的培养时间为 (38.8±4.0) h. 神经胶质瘤细胞系——C6 由上海肿瘤研究所提供, 细胞维持在含有 10% (体积比) 胎牛血清 (PAA, Gibco/BRL) 和 1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养液中, 置 37°C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养. 新生儿脐静脉内皮细胞系——ECV-304 由中国科学院细胞库提供,

培养方法与 Tca8113 同.

1.2 切片样品制备

细胞培养至足够的时间后, 用 PBS 缓冲液漂洗 2 次, 然后以 2% 戊二醛固定液低温 (0~4°C) 固定 1 h. PBS 缓冲液冲洗 2 次后, 用 1% 锇酸固定液固定 1 h. 再以 PBS 冲洗 2 次后, 乙醇梯度脱水, 环氧乙烷过渡, 环氧树脂 618 包埋. 加热时间如下: 45°C 24 h, 60°C 24 h. 在 LKB2088 超薄切片机上切片, 选择不同颜色的片子, 区分正反面转移到新解离的云母片上, 即切片后漂浮在液面上的为正面, 另一面则是反面. 在连续切片带中选择相邻的切片转移并干燥后, 对不同朝向的表面用 Nanoscope III a 型 AFM (Digital Instruments/Veeco, Inc., Santa Barbara, CA) 在空气中观察.

2 结 果

不同厚度的切片表面在 AFM 下呈现不同的形貌, 并且上下表面也有差异. AFM 对 Tca8113 薄片观察显示, 切片厚度小于 50 nm 时, 正反面都表现为细胞低于环氧树脂表面, 即“凹陷”, 见图 1 (a, a'). 图中显示, 细胞的轮廓较清晰, 胞质内的

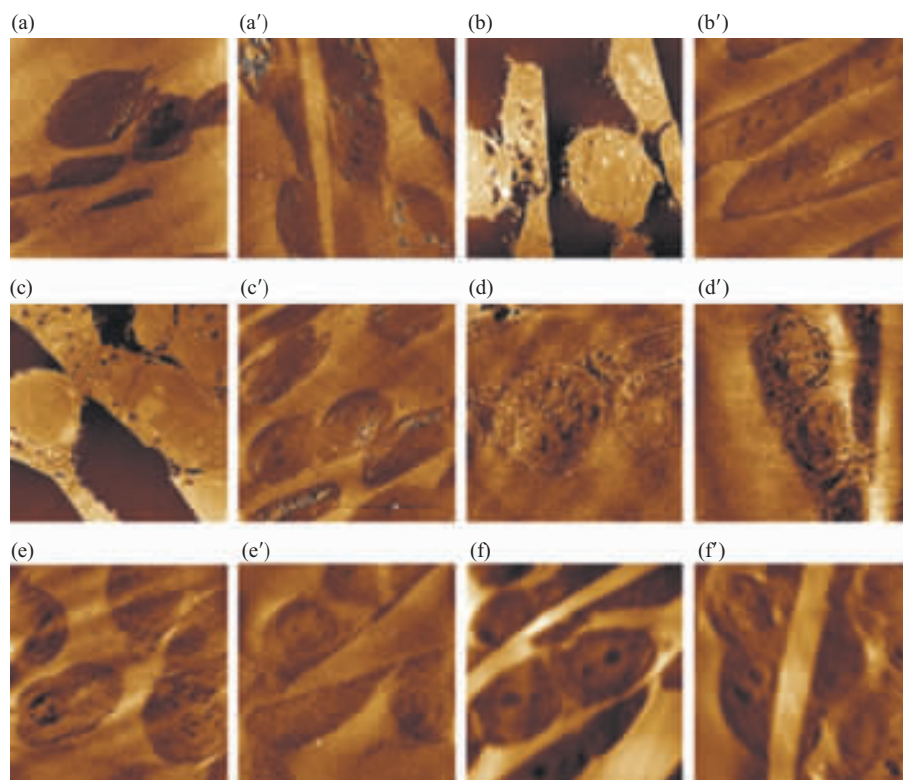


Fig.1 The surface morphology on both of the two sides of Tca8113 sections with different thickness

Thickness ~ 40 nm: (a) the upper side; (a') the lower side. Thickness ~ 60 nm: (b) the upper side; (b') the lower side. Thickness ~ 80 nm: (c) the upper side; (c') the lower side. Thickness ~ 150 nm: (d) the upper side; (d') the lower side. Thickness ~ 500 nm: (e) the upper side; (e') the lower side. Thickness ~ 1 μm: (f) the upper side; (f') the lower side. Scan size: 30 μm × 30 μm.

一些疏松结构因为有大量的环氧树脂渗入填充,所以局部高度基本与胞外的环氧树脂平齐,而细胞内的一些致密结构,如核膜、核仁等是胞内最低,即整个切片表面凹陷最显著的部位.当切片厚度介于50 nm和100 nm之间时,切片正面的细胞表现为高于环氧树脂表面,即“凸起”,并且在切片厚度约为80 nm时,凸起达到峰值,见图1(b, c).该厚度的切片正面AFM图像有着良好的反差和最佳的分辨率,细胞的超微结构形态清晰,可见一些精细结构如细胞膜、核膜、核仁等.细胞间的接触抑制也可观察到.切片反面的细胞却低于环氧树脂,且与正面的凸起相对应,图像反差稍低,但凹陷的细胞轮廓仍然清晰,核仁、核膜的结构相当完整,见图1(b', c').当切片厚度超过120 nm时,正反面细胞都转为凹陷,当厚度为150 nm左右时,正反面形貌部分类似,即同一细胞内凸起和凹陷都有呈现,且两者的起伏都不是很大,反差不好,总的说来,正面的凸起略占优势,见图1(d, d').切片厚度超过200 nm,正反面形貌趋于一致,都表现为细胞明显低于环氧树脂平面,且随厚度增加,细胞凹陷程度显著增大,虽然细胞轮廓仍明显,但亚细胞结构很不清晰,胞内仅见凹陷最深的核仁,反差很差,见图1(e, e')和(f, f').

统计30例样品,得到不同厚度切片正反面细胞相对于环氧树脂平面的高度变化,见图2.从图2

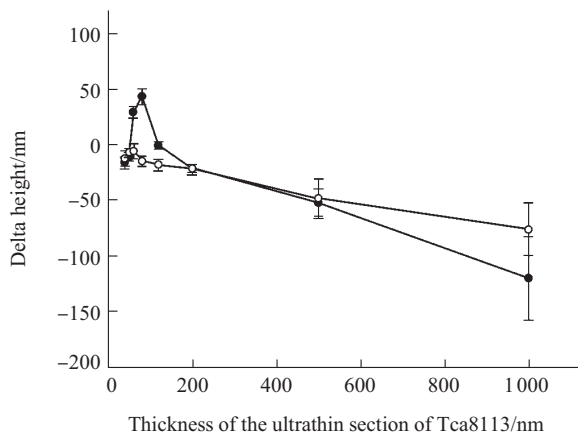


Fig.2 The relative heights of cells as compared with the epoxy resin region on both sides of the Tca8113 epoxy sections with different thicknesses

With increased section thickness, the convexness of the upper side gradually decreased, but no significant change on the lower side surface when the thickness was lower than 200 nm. Both of two sides had a large change when the thickness >200 nm. The results were plotted as the mean of 3~5 independent experiments and the error bars represented the standard deviation. ●—●: the upper side of the surface; ○—○: the lower side of the surface.

中可以看到,在切片厚度小于100 nm时,上下两个表面形貌差异明显:正面细胞高度变化剧烈,在50 nm左右有一个由凹陷向凸起的转变,随后细胞凸起增加,在切片厚度为80 nm左右时达到最大值,为 (43.102 ± 7.242) nm.然后又逐渐下降,并在150 nm左右转为凹陷.反面形貌在上述的厚度范围内变化远不如正面明显,仅有少许的起伏,细胞全部表现为凹陷,且凹陷程度随厚度增加变化不大.切片厚度超过200 nm后,正反面的形貌趋于一致,并且细胞都是凹陷的,凹陷的程度随厚度增加而加深.

对其他2种细胞,C6和ECV-304的观察显示,切片正反面的细胞起伏随着厚度的增加表现相同或相似的变化规律,表明这种现象可能具有一定的普遍性,见图3、4.图3显示,3种细胞切片正面的表面形貌随厚度增加表现出相同的变化趋势,

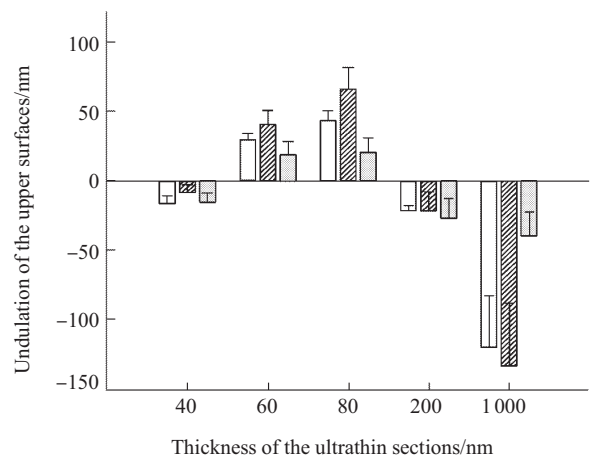


Fig.3 The relative height on the upper side surface of three kinds of cells as the thickness increasing

C6 and ECV-304 showed the same trend like Tca8113, and their convexness reached maximum in 60~80 nm. □: Tca8113; ▨: C6; ■: ECV-304.

即都有凹陷-凸起-凹陷的转变过程.对反面来说,则都表现为凹陷,在较薄的时候,凹陷变化不明显,厚度超过200 nm后,细胞凹陷显著加深,见图4.有意思的是,虽然3种细胞切片正反面的形貌变化趋势相一致,但对于不同的细胞类型彼此之间也还有差别,图3和图4显示,C6细胞的起伏变化与Tca8113相同,而ECV-304的起伏变化不如前2种细胞显著,正反面情况皆如此.对不同厚度的组织切片进行观察,也有这种凹凸起伏的变化,但因为组织比培养细胞复杂得多,所以表面起

伏也更复杂 (图未显示).

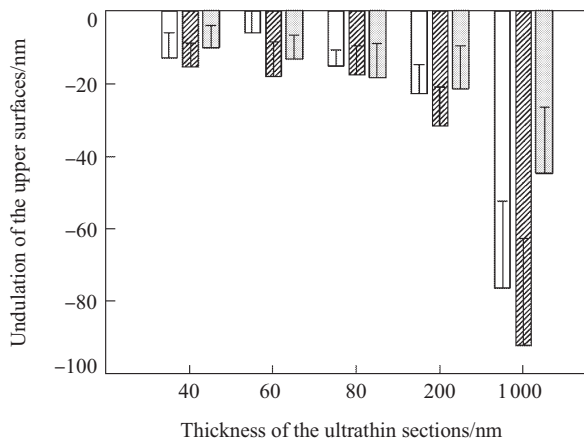


Fig.4 The relative height on the lower side surface of three kinds of cells as the thickness increasing

C6 showed a great concave when the thickness was larger than 80 nm. No significant deviation could be observed on their lower surface when the thickness was lower than 80 nm. □: Tca8113; ▨: C6; ■: ECV-304.

3 讨 论

AFM图像的反差涉及多方面的因素, 长期以来人们将 AFM 用于组织和细胞切片的研究并未具体讨论过反差的问题. 但即便是用金刚石刀切得的最平整的细胞超薄切片, 表面仍有可供 AFM 观察的起伏, 而玻璃刀切的片子则起伏更大些, 即表面粗糙度更大^[23]. 使用颗粒更细的 Epon812 作包埋剂, 切片表面起伏比环氧树脂 618 包埋的切片更小些, 凸起在 5~20 nm 之间, 但随切片厚度变化表面起伏表现与后者相似的变化趋势, 只是变化程度要平缓得多. Osada 等^[20]用一种电子束蚀刻的方法来提高组织切片表面的 AFM 图像分辨率, 提到可能是切片表面局部软硬的差异导致了 AFM 拓扑图像的产生. 常规的超薄切片染色法如铅铀双染色无助于提高 AFM 图像的反差和分辨率. AFM 高度图像的反差是由材料表面的高低差异提供的, 而 TEM 照片的反差主要取决于不同材料本身对电子的散射能力, 而两者的图像如此相似, 且存在一一对应的关系, 是什么因素决定的呢? 我们认为可能是以下的原因:

细胞内各部分的结构复杂, 疏密程度不一, 一些结构如膜、核仁、浓缩的异染色质等较为致密, 而象胞质内部分区域、核内部分区域等较为疏松. 经固定和渗透步骤之后, 环氧树脂较多地渗入胞内

疏松部位, 于是在聚合后这些部分就较硬, 而那些致密部位恰好相反, 因为环氧树脂渗入少而较软. 这样切割时受切应力的作用, 由于材料各部分的软硬不均一性, 发生的软性断裂和硬性断裂各不相同, 产生的形变也有差异, 于是断裂面出现了与材料软硬相关的高低起伏, 而这种软硬不均是由材料本身的复杂结构决定的, 断裂面的形貌反映的是材料本身的精细结构. 因此可以认为 AFM 图像的反差取决于材料自身的局部性质差异. 至于切片过程中刀与包埋块作用的具体过程, 因为涉及到纳米尺度的力学问题, 不能简单套用宏观状态下的应力-应变关系, 因此现在还不能轻易地给出解释, 我们将在以后的研究中通过包埋已知大小和弹性模量的塑料小球, 测量切片过程中小球的形变并进行力学分析, 来进一步探索这个问题, 期望阐释切片厚度对 AFM 图像影响的理论依据.

AFM 图像的反差对于细胞精细结构的分辨至关重要. 反差合适、分辨率佳的 AFM 图像能表现管状髓磷脂 (tubular myelin) 的三维结构^[27], 也可以精确测量角膜上皮细胞的间隙大小^[31], 以及识别如核孔复合物这类复杂组分的构象^[32]等等. 随着“分子手术” (molecular surgery) 技术的兴起^[33-36], 一项重要的应用就是用 AFM 的针尖在组织或者细胞内部进行“手术”, 即在成像基础上利用 AFM 的操纵功能实现对细胞内组分的定位切割、分离和获取, 后续的如 PCR 扩增以及测序等分子生物学样操作, 可以对单个细胞内部基因的时空分布和功能变化作出判断. 毫无疑问, 要实现上述这些目的, 首要问题就要设法尽可能提高切片表面 AFM 图像的反差和分辨率. 高反差的图像细胞内各组分的轮廓边界足够清晰, 保证了定位精度, 是 AFM 手术得以顺利施行必不可少的前提之一. 我们的实验研究表明, 对于组织和细胞切片来说, 影响 AFM 图像反差和分辨率的关键因素之一就是切片厚度的选择. 通过对 3 种来源不同的细胞切片观察结果表明, 厚度在 50~100 nm 之间的切片可能是比较理想的选择, 厚度选择在 80 nm 左右时, 所得的切片上表面 AFM 图像有着最佳的分辨率和最好的反差. 整个细胞都凸出环氧树脂, 轮廓清晰. 胞内的一些超微结构, 如线粒体、核膜、核仁等清晰可见. 处于指数生长期的细胞核质比大, 细胞核占了细胞体积的绝大部分. 而某些处于衰老期的细胞形态已经不甚完整, 核固缩. 这些形态学指标对于切割定位来说至关重要. 此外, 切片厚度不仅影响定位精度,

对手术时切割力大小的选择也很关键, 我们初步的试验表明, 厚度在 50~100 nm 的切片, 施加 50~200 nN 大小的切割力, 能获得良好的切割效果.

我们的实验结果对于选择合适厚度的切片来进行亚细胞尺度的 AFM 表面研究提供了较为可靠的依据, 有助于探索超薄切片表面 AFM 图像的反差机制, 同时有可能成为进一步研究切片过程中刀与包埋块作用的纳米力学的基础.

致谢 作者感谢上海交通大学分析测试中心和上海第二医科大学细胞生物学实验室给予的设备使用方面的支持和实验方面的指导. 上海交通大学机械工程系李四平老师对本文提出了有益的建议, 在此一并致谢.

参 考 文 献

- Sautet P. Images of adsorbates with the scanning tunneling microscope: theoretical approaches to the contrast mechanism. *Chem Rev*, 1997, **97** (4): 1097 ~ 1116
- Schneider G. Cryo X-ray microscopy with high spatial resolution in amplitude and phase contrast. *Ultramicroscopy*, 1998, **75** (2): 85 ~ 104
- Ura K. Contrast mechanism of negatively charged insulators in scanning electron microscope. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1998, **47** (2): 143 ~ 147
- Valle P J, Carminati R, Greffet J. Contrast mechanisms in illumination-mode SNOM. *Ultramicroscopy*, 1998, **71** (1): 39 ~ 48
- Perez R, Payne M C, Stich I, *et al.* Contrast mechanism in non-contact AFM on reactive surfaces. *Appl Surf Sci*, 1998, **123-124** (1): 249 ~ 254
- Sakai Y, Yamada T, Suzuki T, *et al.* Contrast mechanisms of secondary electron images in scanning electron and ion microscopy. *Appl Surf Sci*, 1999, **144-145** (1): 96 ~ 100
- Shluger A L, Livshits A I, Rohl A L. Contrast mechanism in non-contact SFM imaging of ionic surfaces. *Appl Surf Sci*, 1999, **140** (3~4): 327 ~ 332
- Silly F, Charra F. Time-correlations as a contrast mechanism in scanning-tunneling-microscopy-induced photon emission. *Ultramicroscopy*, 2004, **99** (2-3): 159 ~ 164
- 郑国锷, 谷祝平. 生物显微技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1993. 81 ~ 83
Zheng G C, Gu Z P. *Techniques for Biological Microscopy*. 2nd. Beijing: Higher Education Press, 1993. 81 ~ 83
- Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, **56** (9): 930 ~ 933
- Hansma H G, Pietrasanta L. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2** (5): 579 ~ 584
- Hansma H G. Varieties of imaging with scanning probe microscopes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (26): 14678 ~ 14680
- Müller D J, Baumeister W, Engel A. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (23): 13170 ~ 13174
- Matzke R, Jacobson K, Radmacher M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (6): 607 ~ 610
- Kuznetsov Y G, Malkin A J, Lucas R W, *et al.* Imaging of viruses by atomic force microscopy. *J Gen Virol*, 2001, **82** (pt 9): 2025 ~ 2034
- Dufrène Y F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol*, 2002, **184** (19): 5205 ~ 5213
- Hörber J K H, Miles M J. Scanning probe evolution in biology. *Science*, 2003, **302** (5647): 1002 ~ 1005
- Willemsen O H, Snel M M E, Cambi A, *et al.* Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy. *Biophys J*, 2000, **79** (6): 3267 ~ 3281
- Fisher T E, Marszalek P E, Oberhauser A F, *et al.* The micro-mechanics of single molecules studied with atomic force microscopy. *J Physiol*, 1999, **520** (1): 5 ~ 14
- Forbes J G, Lorimer G H. Unraveling a membrane protein. *Science*, 2000, **288** (5463): 63 ~ 64
- Oberhauser A F, Hansma P K, Carrion-Vazquez M, *et al.* Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (2): 468 ~ 472
- Jiang Y, Qin F, Li Y, *et al.* Measuring specific interaction of transcription factor ZmDREB1A with its DNA responsive element at the molecular level. *Nucl Acids Res*, 2004, **32** (12): e101
- Amako K, Takade A, Umeda A, *et al.* Imaging of the surface structures of epon thin sections created with a glass knife and a diamond knife by the atomic force microscope. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1993, **42** (3): 121 ~ 123
- Ushiki T, Shigeno M, Abe K. Atomic force microscopy of embedment-free sections of cells and tissues. *Arch Histol Cytol*, 1994, **57** (4): 427 ~ 432
- Yamashina S, Shigeno S. Application of atomic force microscopy to ultrastructural and histochemical studies of fixed and embedded cells. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1995, **44** (6): 462 ~ 466
- Osada T, Arakawa H, Ichikawa M, *et al.* Atomic force microscopy of histological sections using a new electron beam etching method. *J Microsc*, 1998, **189** (1): 43 ~ 49
- Nag K, Munro J G, Hearn S A, *et al.* Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant. *J Struc Biol*, 1999, **126** (1): 1 ~ 15
- Melling M, Karimian-Teherani D, Behnam M, *et al.* Morphological study of the healthy human oculomotor nerve by atomic force microscopy. *NeuroImage*, 2003, **20** (2): 795 ~ 801
- Hayat M A. *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. 2nd. Maryland: Univ Park Press, 1981. 307 ~ 309
- 康莲娣. 生物电子显微技术. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003. 31 ~ 35
Kang L D. *Biological Electron Microscopy*. Hefei: Univ Sci Tech China Press, 2003. 31 ~ 35

- 31 Tsilimbaris M K, Lesniewska E, Lydataki S, *et al.* The use of atomic force microscopy for the observation of corneal epithelium surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41** (3) : 680 ~ 686
- 32 Stoffer D, Steinmetz M O, Aebi U. Imaging biological matter across dimensions: from cells to molecules and atoms. *FASEB J*, 1999, **13** (2) : 195 ~ 200
- 33 Yamamoto T, Kurosawa O, Kabata H, *et al.* Molecular surgery of DNA based on electrostatic micro-manipulation. *IEEE T IND Appl*, 2000, **36** (4) : 1010 ~ 1016
- 34 Hu J, Zhang Y, Gao H, *et al.* Artificial DNA patterns by mechanical nanomanipulation. *Nano Lett*, 2002, **2** (1) : 55 ~ 57
- 35 Stark R W, Rubio-Sierra F J, Thalhhammer S, *et al.* Combined nanomanipulation by atomic force microscopy and UV-laser ablation for chromosomal dissection. *Eur Biophys J*, 2003, **32** (1) : 33 ~ 39
- 36 Lü J, Li H, An H, *et al.* Positioning isolation and biochemical analysis of single DNA molecules based on nanomanipulation and single-molecule PCR. *J Am Chem Soc*, 2004, **126** (36) : 11136 ~ 11137

Effect of The Thickness of Cell Ultrathin Sections on The Topographical Contrast in Atomic Force Microscopy*

LI Xin-Hui¹⁾, JI Tong²⁾, SUN Jie-Lin¹⁾, ZHANG Chen-Ping²⁾, HU Jun^{1,3)**}

¹⁾Nanobiology Laboratory, Bio-X Life Science Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China;

²⁾Shanghai Second Medical University Affiliated No. 9 People's Hospital, Shanghai 200011, China;

³⁾Shanghai Institute of Applied Physics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract The effect of the thickness of ultrathin sections on the topographical contrast in the images of atomic force microscopy (AFM) had been studied. Three different cell lines, Tca8113, C6 and ECV-304 were treated with conventional TEM fixation and embedment techniques. Cut by ultramicrotomy and collected with mica pieces, thin sections with different thickness were imaged by AFM on both sides. The images observed from the lower surfaces showed that the cell regions were always concave compared to the epoxy resin regions, and the concavity was increased with the increase of the ultrathin section thickness. Interestingly, the images from upper surfaces showed a peculiar convexness in the cell regions when the thickness is small, and achieved a maximum when the thickness was about 80 nm, and finally became concave when the thickness was larger than 120 nm. Statistic analysis showed that this trend was a general phenomenon. The relevant mechanism has been discussed.

Key words surface morphology, topographical contrast, ultrathin section, atomic force microscopy

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300389) and Shanghai Jiaotong University (SJTU) & Shanghai Second Medical University (SSMU) cooperation foundation.

**Corresponding author . Tel: 86-21-64077360, Fax: 86-21-64472577, E-mail: jhu@sjtu.edu.cn

Received: December 31, 2004 Accepted: February 28, 2005