



УДК 577.113.(012+088.52)

НЕХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОДИФИКАЦИИ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 1995 г. И. В. Тузов*, Е. В. Юркова, Д. В. Клинов, В. В. Демин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.03.94 г. После доработки 10.11.94 г.

Разработаны два простых метода фиксации молекул ДНК на слюде для последующей визуализации с помощью атомно-силовой микроскопии. Отличительными особенностями предлагаемых методов являются их простота, отсутствие этапов химической модификации подложки, а также возможность получения изображений на воздухе при относительно высокой влажности. Проведенное сравнение характеристик полученных изображений показало, что предлагаемые методы конкурентоспособны в сравнении с ранее предложенными.

Ключевые слова: сканирующая микроскопия; модификация поверхности; ДНК; физическое картирование.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – наиболее молодой и перспективный метод структурного анализа [1]. Высокоразрешающие изображения удается получать не только при высоком вакууме, но и на воздухе и даже под слоем жидкости, что делает этот метод привлекательным для изучения структуры биополимеров. Основным препятствием широкого применения АСМ в структурной биологии является неразработанность методик приготовления образцов для такого исследования. Главная проблема – фиксация образцов на поверхности подложек. Для устойчивой визуализации, а также высокого разрешения изображений необходимо прочное связывание объекта подложкой, делающее невозможным перемещение молекулы в целом или ее отдельных частей под действием зонда, которым производится сканирование.

Одним из объектов исследования методом АСМ является ДНК. При этом в большинстве случаев в качестве подложки используют слюду. В основном этот выбор объясняется атомарной ровностью скола слюды на участках в несколько десятков квадратных микрон. Одна из проблем состоит в том, что ДНК недостаточно прочно связывается с такими подложками, что затрудняет ее наблюдение. Чтобы получить более прочное связывание, применяют ионную обработку слюды [2, 3]. Однако нанесенная на такую подложку ДНК может быть успешно визуализирована лишь при достаточно низкой влажности окру-

жающего воздуха (меньше 40% [2, 4]). Улучшения разрешения можно достичь путем микроскопирования под слоем пропанола [5] и/или использованием специально приготовленных зондов с “заостренными” кончиками [2, 5, 6], что позволяет исключить эффект капиллярной конденсации паров воды на поверхности слюды и уменьшить силу взаимодействия зонда с исследуемой поверхностью. Хорошие результаты получаются при химической модификации слюды до нанесения на нее ДНК [7]. Эти образцы можно исследовать в воздухе при повышенной влажности и даже погруженными в воду. Однако приготовление таких образцов более трудоемко. В данной работе предлагаются два относительно простых метода подготовки образцов ДНК на слюде, позволяющих получать устойчивое изображение молекулы на воздухе с использованием коммерческих зондов при относительно высокой влажности. К достоинствам предлагаемых методов следует отнести их простоту, а также отсутствие этапов химической модификации подложки, требующих использования высокочистых и, следовательно, дорогих реагентов, что делает их конкурентными по сравнению с классической электронной микроскопией.

Возможность получения изображения ДНК методом АСМ и его качество во многом зависят от того, насколько прочно связываются исследуемые молекулы с подложкой. При нанесении ДНК на поверхность свежесколотой слюды из буфера, не содержащего двухвалентных ионов, прочность посадки недостаточна. Это приводит к

* Автор для переписки.

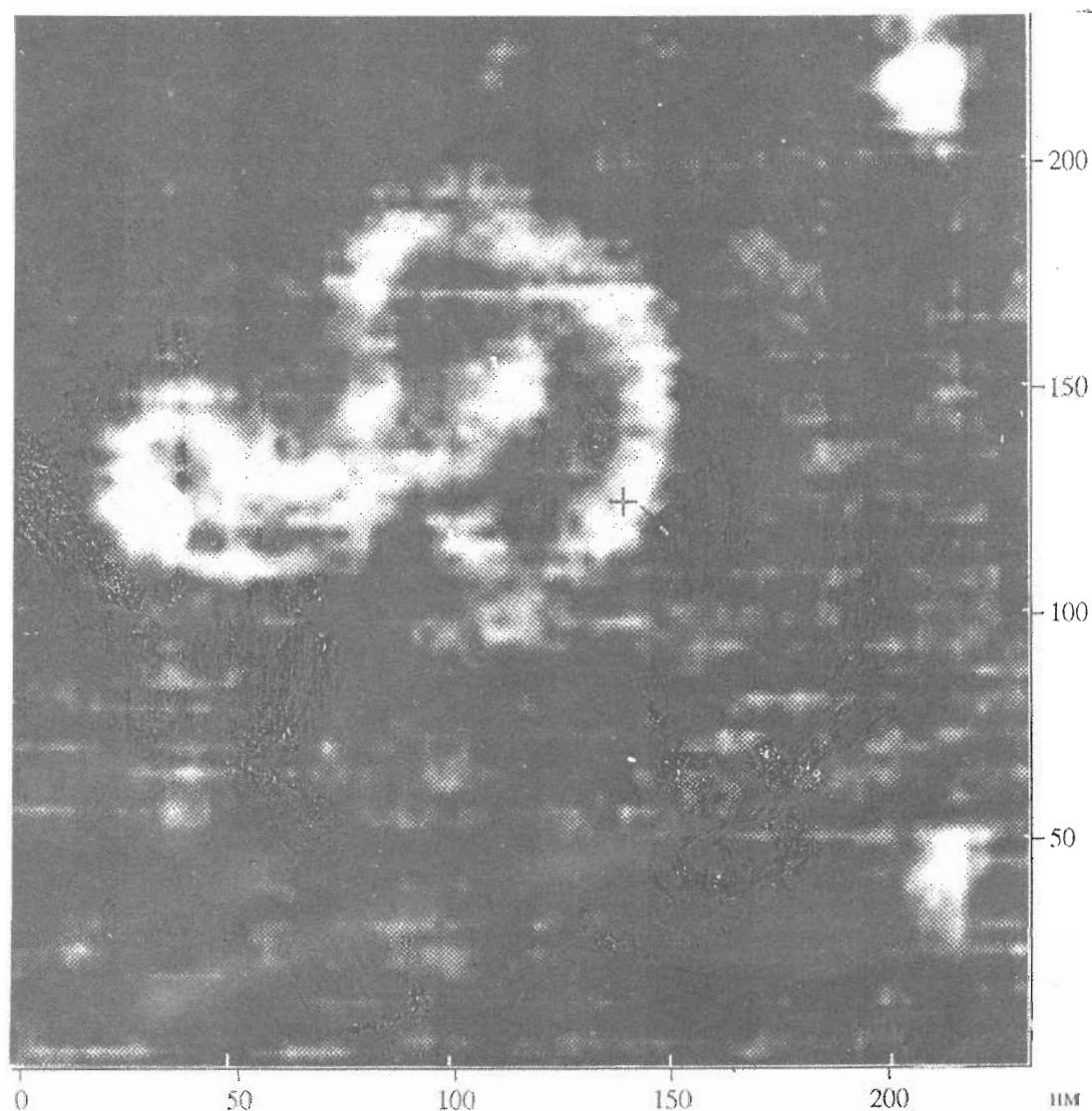


Рис. 1. ДНК, нанесенная на свежесколотую слюду в присутствии ионов Mg^{2+} (метод А).

тому, что при сканировании препарата зонд отрывает молекулу от подложки и делает невозможным получение ее изображения. Присутствие ионов магния упрочняет взаимодействие молекул ДНК со слюдой. Однако качество их изображений зависит в значительной степени от условий наблюдения [2].

На рис. 1 представлено изображение молекулы ДНК, нанесенной на свежесколотую поверхность слюды из буфера, содержащего ионы Mg (метод А), полученное при влажности воздуха 70%. Изображение имеет плохое качество, молекулы скомканы или не прослеживаются по всей их длине. При повторном сканировании изображение пропадает, т.е. оно нестабильно. Повышенная влажность воздуха приводит к тому, что вода неизбежно адсорбируется на поверхности

слюды и вызывает значительное увеличение силы взаимодействия зонда с поверхностью. В наших исследованиях она составляла 80 - 100 нН, в то время как при влажности меньше 40% находится на уровне порядка 10 нН [2]. По-видимому, при высокой влажности сила взаимодействия зонда с молекулой становится сравнимой с силой взаимодействия молекулы с поверхностью слюды, что приводит к отрыву молекулы от подложки при сканировании и, следовательно, к плохому качеству изображения. Требование поддержания пониженной влажности воздуха накладывает ограничения на использование этого метода. Поэтому мы попытались разработать достаточно простые способы приготовления препаратов, позволяющих получать изображение ДНК в условиях повышенной влажности воздуха.

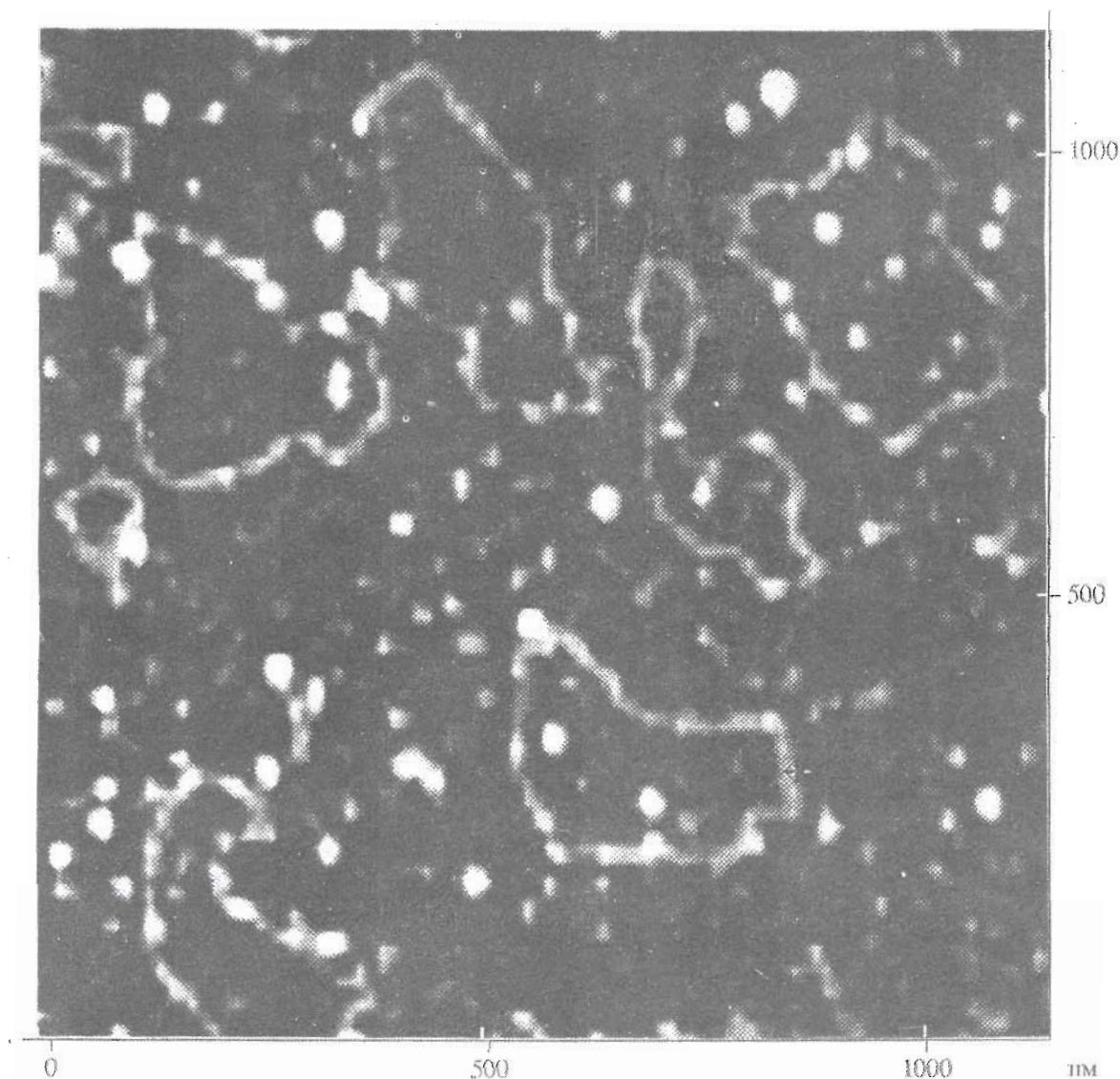


Рис. 2. ДНК, нанесенная на свежесколотую слюду в присутствии ионов Mg^{2+} и оттененная Pt-C-смесью (метод Б).

В первом случае (метод Б) увеличение позиционной стабильности молекулы достигалось нанесением тонкого слоя Pt-C-смеси на поверхность скола слюды с адсорбированной на ней ДНК аналогично тому, как это делается при оттенении препаратов для электронно-микроскопического исследования [8]. Оказалось, что напыления Pt/C-слоя толщиной 0.5 нм достаточно для получения стабильных изображений. В другом случае (метод В) усиления связывания ДНК с подложкой достигали изменением свойств последней. Для этого до нанесения ДНК на поверхность скола слюды напыляли тонкий (0.5 нм) слой углерода. Такая предварительная обработка дает возможность наносить ДНК на подложку даже в отсутствие ионов Mg^{2+} .

Изображения, полученные методом атомно-силовой микроскопии с препаратов, приготовленных такими способами, представлены на рис. 2, 3. В обоих случаях наблюдение проводили на воздухе при влажности 80%. Полученные изображения стабильны и не меняются при сканировании в течение по крайней мере 20 мин. Изображения ДНК имеют вид, сходный с типичным для электронной микроскопии [8], и молекулы хорошо прослеживаются по всей своей длине. Определенные по ним геометрические параметры молекул представлены в таблице.

Ширина изображений ДНК, измеренная у основания соответствующего пика профиля рельефа (рис. 3, вставка), примерно одинакова для всех трех методов приготовления образцов. Она значительно

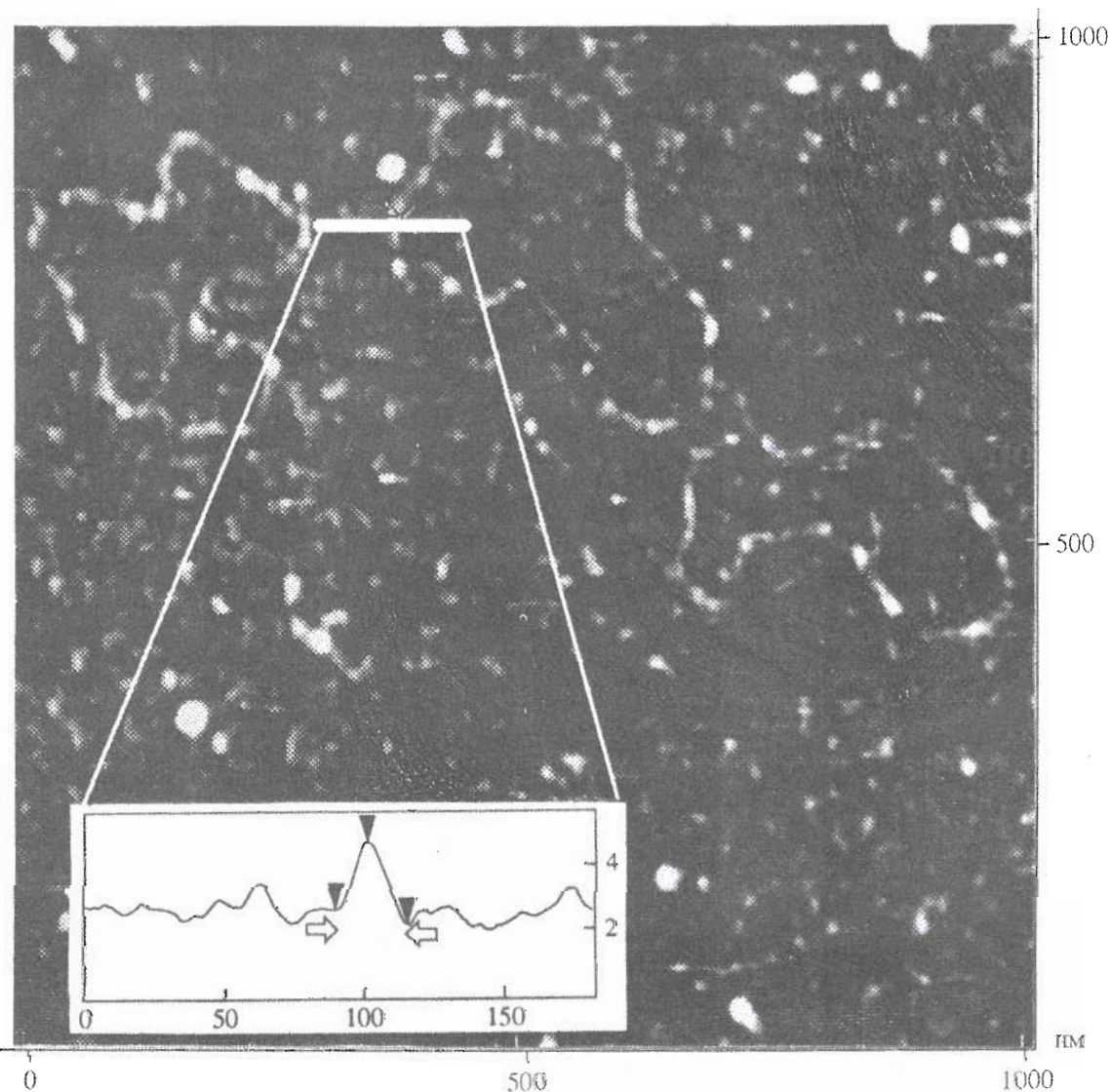


Рис. 3. ДНК, нанесенная на свежесколотую слюду, на которую предварительно напылен тонкий слой углерода (метод В). На вставке – профиль рельефа поверхности в направлении, близком к нормальному по отношению к нити молекулы. Высоту и ширину у основания пика измеряли между черными и белыми стрелками соответственно.

превышает реальный диаметр молекулы ДНК, равный 2 нм. В значительной мере такое уширение может быть объяснено геометрией зонда [2, 9]. Для учета этого эффекта обычно используется простая геометрическая модель (рис. 4а), предполагающая, что зонд представляет собой сферу радиусом R , а исследуемая молекула ДНК – цилиндр радиусом r , и в ходе съемки регистрируется не сама молекула, а кривая ее огибания зондом (рис. 4а, см. также кривую ПБК рис. 4б). Реальный размер молекулы ДНК может быть определен по уравнению $W = 4\sqrt{Rr}$. С учетом того, что диаметр промышленных зондов равен 30 - 50 нм [2, 7, 10], расчет по этой формуле дает, исходя из таблицы, диаметры молекулы ДНК 2.3 - 3.9, 5.1 - 8.4

и 4.6 - 7.6 нм для методов А, В и С соответственно, что превышает ее реальный размер.

Такое различие, возможно, связано с тем, что на ширину изображения влияют также другие факторы. Например, известно, что повышение влажности приводит к увеличению ширины изображения [10], что связано с изменением площади контакта зонда и образца из-за образования между ними мениска жидкости. Кроме того, налипание на зонд примесного материала, слабо адсорбированного на поверхности слюды, также может приводить к искажению измеряемой ширины [5]. В нашем случае напыление на подложку углерода или отложение молекул Рf-С-смесью вызывает увеличение шероховатости поверхности и, как следствие, заметное возрастание шумов на

изображениях (таблица). В результате увеличивается погрешность измерения ширины молекулы по основанию соответствующего пика на профиле рельефа (рис. 4б, участок X). В этих условиях удобнее измерять ширину не у основания пика, а, например, на половине его высоты. При этом следует учесть, что простая геометрическая модель цилиндра (рис. 4а) не соответствует реальному эксперименту, поскольку измеряемые значения высот и ширин молекул ДНК разнятся значительно (таблица), поэтому мы использовали другую модель.

В предположении, что объект в сечении может быть представлен эллипсом, кривая огибания зонда КС (рис. 4б) может быть описана следующим уравнением:

$$D(h) = \frac{a+R}{b+R} \sqrt{4bR + h(2b - 2R - h)}, \quad (1)$$

где h – высота зонда над поверхностью, D – расстояние его до середины нити молекулы, R – радиус зонда, b и a – полувысота и полуширина молекулы соответственно. Из уравнения (1) следует, что измеряемое значение ширины пика равно диаметру молекулы, т.е. $D(h) = a$ только тогда, когда измерение проводится на высоте

$$h = \frac{R+b}{R+a} \sqrt{2Ra + R^2} + b - R. \quad (2)$$

В идеальном случае, когда зонд гораздо тоньше ширины молекулы, из уравнения (2) получаем, что реальную ширину молекулы даст измерение, проведенное на высоте, равной половине высоты пика $h = b$. Однако зонд имеет размеры, значительно превосходящие диаметр молекулы ДНК, и высота h из уравнения (2) зависит от соотношения размеров зонда и молекулы. В этом случае оценка реальной ширины молекулы может быть сделана по формуле, получаемой из уравнения (1):

$$D_{\text{реал}} = \sqrt{D_{1/2}^2 + 4R^2} - 2R, \quad (3)$$

где $D_{1/2}$ – измеренная ширина молекулы по профилю на половине ее высоты соответствующего пика, $D_{\text{реал}}$ – реальная ширина молекулы.

Параметры изображений: ДНК, полученных различными методами. (Все значения получены усреднением по случайным выборкам ($n = 10$)).

Метод приготовления образцов	Длина ДНК, нм*	Ширина молекулы, нм		Высота молекулы, нм	Уровень шума, нм***	Контраст***
		у основания пика	на 1/2 высоты пика			
А	—	21.6 ± 3.3	11. ± 0.4	0.45 ± 0.08	0.14	2.7
Б	937 ± 82	31.8 ± 4.7	14 ± 1.7	2.7 ± 0.4	0.46	5.8
В	1012 ± 94	30.2 ± 1.8	14 ± 1.4	2.2 ± 0.3	0.42	5.2

* Погрешность вычислялась как среднеквадратичный разброс значений длин.

** Приведенные значения уровня шума, вычислялись как: среднее арифметическое шум по участку поверхности 1000 × 1000 нм².

*** Приведенные значения контраста, вычислялись как отношение высоты молекулы к уровню шума.

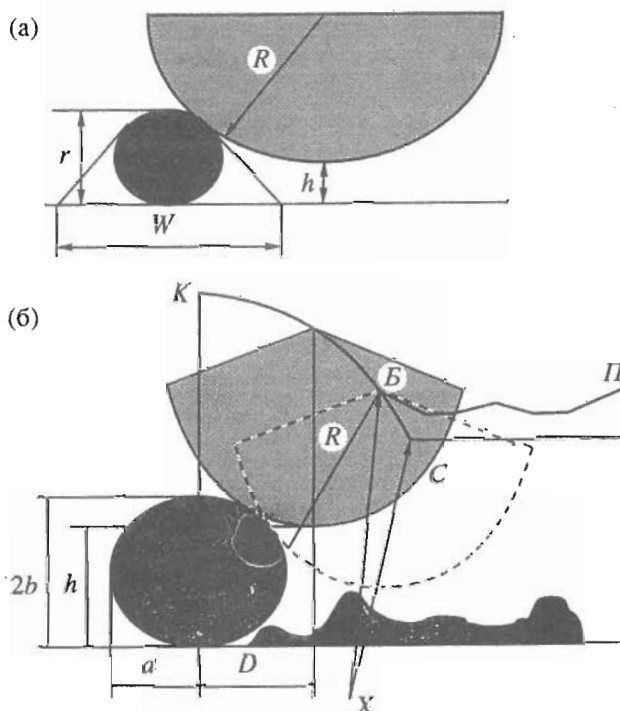


Рис. 4. а – геометрическая модель огибания зондом радиуса R молекулы ДНК радиусом r ; W – ширина молекулы, измеряемая у основания пика профиля. б – модель огибания зондом молекулы ДНК с высотой $2b$ и шириной $2a$; $C-K$ – кривая огибания зондом молекулы, описываемая уравнением (1); $P-B-K$ – регистрируемый рельеф поверхности; участок X соответствует основанию пика, «маскируемому» вблизи молекулы рельефом поверхности; D – расстояние до середины нити молекулы; h – высота зонда над поверхностью.

В наших экспериментах оценка по формуле (3) с учетом того, что диаметр используемого промышленного зонда составляет 30 - 50 нм, дает, исходя из таблицы, ширину молекул ДНК порядка 1.9 - 3.1 нм в методах В и С и 1.2 - 2.0 нм в методе А. Таким образом, использование этого способа расчета позволяет получить значение искомого параметра, более близкое к ожидаемому.

В опубликованных к настоящему времени работах высота молекул ДНК, измеренная по

изображениям, полученным методом атомно-силовой микроскопии, обычно меньше реального диаметра нити ДНК [4], что объясняют деформацией молекулы при прохождении над ней зонда при сканировании. Степень деформации возрастает с увеличением влажности окружающей среды, что связано, по-видимому, с усилением капиллярных взаимодействий. Так, в условиях с пониженной влажностью измеренная высота ДНК составляет 1.3 - 1.4 нм [6, 11, 12], тогда как в обычных условиях - 0.2 - 0.4 нм [7].

В наших исследованиях препаратов, приготовленных по методу А и проведенных во влажных условиях (70%), получены аналогичные результаты: высота молекулы составляет 0.38 нм. В то же время напыление Pt или углерода на поверхность слюды (методы Б и В) позволило получить значение высоты 2.2 - 2.7 нм, близкое к реальному диаметру молекулы ДНК. И хотя напыление повышает уровень шумов при сканировании подложки, увеличение высоты молекулы приводит к увеличению контраста изображения (таблица).

Длину молекулы ДНК обычно рассчитывают исходя из величины 0.26 нм/(пара оснований) для дегидратированной формы А или 0.34 нм/(пара оснований) для гидратированной формы В [12]. Длина молекул, измеренная по изображениям с препаратов, приготовленных методами Б и В (таблица), согласуется с точностью 9% с расчетной длиной гидратированной формы, что, по-видимому, отражает ее конформационное состояние на подложке в условиях повышенной влажности.

Таким образом, предлагаемые методы подготовки образцов ДНК пригодны для ее визуализации методом атомно-силовой микроскопии. Они просты, используют обычные методики и оборудование, не требуют химической модификации подложки или поддержания низкой влажности окружающей среды. Методы позволяют получить стабильное изображение молекул ДНК с разрешением, близким к другим описанным в литературе методам. Относительно низкая трудоемкость и быстрота делают эти методы привлекательной альтернативой классической электронной микроскопии при решении таких задач, как, например, определение длин рестриктных фрагментов или физического картирования ДНК с использованием маркеров подходящего размера или имеющих в своем составе соответствующие метки. То обстоятельство, что модификация слюды напылением углерода позволяет также достаточно прочно адсорбировать ДНК в отсутствие двухвалентных катионов, может оказаться важным при использовании в качестве сайт-специфических маркеров таких белков, как, например, метилаза [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали плазмидную ДНК РТ10, производную рUC19 (2.7 кб).

Метод А. ДНК в 20 мМ NH_4Ac -буфере (рН 7.2), содержащем 20 мМ MgCl_2 , помещали на свежесколотую слюду. Через 10 мин излишки буфера удаляли фильтровальной бумагой и поверхность промывали 10 мМ NH_4Ac -буфером, содержащим 70% этанола. Затем образец высушивали 1 ч в вакууме при давлении 10^{-6} Торр.

Метод Б. Препарат ДНК наносили на подложку по методу А. Затем оттеняли платино-углеродной смесью (Pt-C) под углом 3° к поверхности при вращении. Интегральная толщина напыления составляла 0.5 нм.

Метод В. На поверхность свежесколотой слюды при давлении 10^{-6} Торр под углом 90° к поверхности напыляли при вращении слой углерода толщиной 0.5 нм. Сразу после этого на поверхность помещали раствор ДНК в 10 мМ NH_4Ac -буфере (рН 7.2). Через 10 мин излишки буфера убрали фильтровальной бумагой и образец высушивали 1 ч в вакууме при давлении 10^{-6} Торр.

Напыление углерода и платины проводили в вакуумной установке JEE4C (Jeol, Япония). Толщину напыления контролировали с помощью кварцевого резонансного измерителя толщины QSC 201D (Balzers, Лихтенштейн).

Изображение получали на Nanoscope II, используя промышленные зонды Si_3N_4 (Digital Instruments, США с константой жесткости 0.38 Н/м. Частота сканирования 8.6 Гц.

Длину ДНК измеряли по распечаткам изображений с использованием ручного дигитайзера, соединенного с компьютером. Размеры рассчитывали усреднением измерений, произведенных по 10 различным изображениям.

Авторы выражают свою благодарность канд. хим. наук С.В. Волику за предоставление препарата ДНК и чл.-кор. РАН Е.Д. Свердлову за постоянное внимание к данной работе, а также полезные замечания при обсуждении полученных результатов. Работа была поддержана ГКНТП "Геном человека", грант "Хромосома-19 человека".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Binning G. // Ultramicroscopy. 1992. V. 42 - 44. P. 7 - 15.
2. Bastamante C., Vesenska J., Tang C.-L., Rees W., Guthold M., Keller R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 22 - 26.
3. Thundat T., Allison D.P., Warmack R.J., Doktycz M.J., Jacobson K.B., Brown G.M. // Scanning Microscopy. 1992. V. 6. № 4. P. 911 - 918.
4. Thundat T., Allison D.P., Warmack R.J., Doktycz M.J., Jacobson K.B., Brown G.M. // J. Vac. Sci. Technol. Jul./Aug. 1993. A 11(4). P. 824 - 828.

5. Hansma H.G., Sinsheimer R.L., Li M.-Q., Hansma P.K. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 14. P. 3585 - 3590.
6. Vesenka J., Guithold M., Tang C.L., Keller D., Delaine E., Bastamante C. // Ultramicroscopy. 1992. V. 42 - 44. P. 1243 - 1249.
7. Lubchenko Y., Shlyakhtenko L., Harrington R., Oden P., Lindsay S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. March 1993. V. 90. P. 2137 - 2140. Biophysics.
8. Electron Microscopy in Molecular Biology. A Practical Approach // Eds Sommerville J., Scheer U. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1987.
9. Thundat T., Zheng X.-Y., Sharp S.L., Allison D.P., Warmack R.J., Joy D.C., Ferrel T.L. // Scanning Microscopy. 1992. V. 6. P. 903 - 910.
10. Thundat T., Warmack R.J., Allison D.P., Bottomley L.A., Lourenco A.J., Ferrel T.L. // J. Vac. Sci. Technol. 1992. V. 10. P. 630 - 635.
11. Murray M.N., Hansma H.G., Bezanilla M., Sanó T., Ogletree D.F., Kolbe W., Smith C.L., Cantor C.R., Spengler S., Hansma P.K., Salmeron M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3811 - 3814.
12. Shaiu W.-L., Larson D.D., Vesenka J., Henderson E. // Nucl. Acids. Res. 1993. V. 21. № 1. P. 99 - 103.

Non-Chemical Modification of Supports for Studies of Biopolymers by Atomic Force Microscopy

I. V. Tuzov*, E. V. Yurkova, D. V. Klínov, and V. V. Demin

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow. 117871 Russia*

Abstract – Two simple procedures of DNA molecule fixation on mica for following imaging by the atomic force microscopy were developed. The distinctive features of the procedures are their simplicity, absence of chemical modification stages, and the possibility to obtain the images in air under relative high humidity. Comparison of the features of the images obtained indicated that the procedures developed were competitive with the procedures earlier suggested.

Key words: scanning microscopy, surface modification, DNA, physical mapping.

* To whom correspondence should be addressed.