

DNA 分子及其双链断裂碎片的 AFM 观测

倪岷楠¹ 赵葵^{1,2} 隋丽¹ 梅俊平^{1,3} 郭继宇¹ 王如瑜⁴

¹(中国原子能科学研究院核物理研究所 北京 102413)

²(北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室 北京 100875)

³(河北工业大学 天津 300130)

⁴(中国科学院理化技术研究所 北京 100101)

摘要 DNA 是生命信息的载体,是辐射生物学效应最重要的靶分子。研究 DNA 辐射损伤机理,需掌握观测 DNA 分子及其双链断裂(Double Strand Breaks, DSB)碎片的技术。在大气状态下,使用原子力显微镜(AFM)技术获得了3种经提纯的 DNA 分子的直观图像。在水溶液中,利用²⁴¹Am- α 源辐照装置对其中一种 DNA 分子作低剂量照射,首次获得了 DNA 双链断裂碎片的 AFM 图像。为研究不同类型辐射—特别是重离子辐射—导致的 DNA 双链断裂几率的统计模型,做了技术准备。

关键词 DNA, AFM, 生物样品吸附, AFM 针尖展宽效应, 双链断裂

中图分类号 Q6-33, Q691.5

电离辐射诱发生物损伤的物理化学机理是辐射生物学和放射医学的基础课题之一,又是涉及物理学与生物学、化学和医学等多学科交叉的一个重要领域。DNA 是生命信息的载体,是辐射生物学效应的最重要靶分子。研究表明, DNA 双链断裂是辐射引起的各种生物效应中最重要的原初损伤。研究辐照后早期 DNA 双链断裂的物理化学机理,将有助于了解生物体的后期生物学效应,并建立起它们之间的联系。在分子水平上,系统地观测和研究 DNA 双链断裂在基因组中的分布规律, DNA 损伤的修复过程及其机理,可以为重离子治癌和载人航天飞行等应用,进行基础性与先导性研究。测量 DNA 链断裂的常规方法有中性梯度沉降、中性过滤淘析、凝胶电泳和早期染色体凝缩等。它们都有其适用范围和局限性,不同程度地存在灵敏度不够高,以及物理基础不清楚等问题。利用透射电子显微镜(TEM)和扫描隧道显微镜(STM)等技术也可获得单个 DNA 分子的图像,但这些观测技术在许多方面存在着不同程度的缺陷,如分辨率不够高,样品制备过程繁琐,对 DNA 分子的结构损伤较大等等。

原子力显微镜(AFM)技术的发明以及分子生物学技术的不断改进,大大提高了人们对 DNA 分子的实时观测能力^[1]。利用 AFM 观测 DNA 样品,

所需的样品制备技术相对简化。AFM 的轻敲扫描模式(Tapping mode)可使其针尖对样品的作用力控制在小于 1.0×10^{-9} 的范围内,从而将扫描过程中针尖对样品的损伤降低到可被忽略的水平。同时, AFM 的 Tapping mode 横向分辨率达到了 0.1nm,能够探测到直径为 2nm 的 DNA 双螺旋结构。因此, AFM 被认为是观测 DNA 分子及其片断的最好工具^[2]。

我们利用美国 DI 公司 Nanoscope IIIa 型 AFM 的 Tapping mode 功能,对沉积在 APTES-云母衬底及纯云母表面的 DNA 分子进行了常温下大气中的观测,得到了清晰的图像,并对两种衬底上的 DNA 分子图像进行了比较。作为进一步研究电离辐射致 DNA 双链断裂机理的准备工作,我们使用自行设计的²⁴¹Am- α 源辐照装置辐照 pGEMT-1 质粒的开环超螺旋 DNA,并成功地首次观测到 DNA 双链断裂碎片的 AFM 图像。

1 实验准备

1.1 DNA 样品的提纯

实验用的质粒 DNA 由军事医学科学院放射医学研究所放射毒理实验室构建。图 1 是质粒 DNA pGEMT-1 的电泳图。实验样品的种类及其特点列于表 1。

国家自然科学基金(10175095)资助

第一作者:倪岷楠,男,1974年4月出生,1998年毕业于中国科学技术大学近代物理系,2001年在中国原子能科学研究院获得硕士学位,粒子物理及原子核物理专业,实习研究员

收稿日期:初稿 2003-01-13,修回 2003-05-22

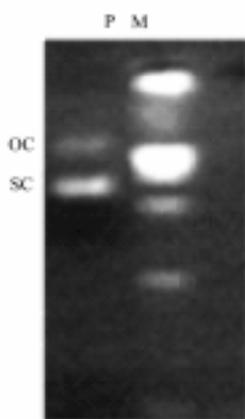


Fig.1 Electrophoregram of plasmid pGEMT-1 DNA (P) SC: Supercoil conformation, OC: Open circle conformation. 80% of the molecules are supercoil DNA.

Table 1 Features of DNA samples

DNA samples	Mean length (kpb)	Conformation
pHAZE	10.0 (3.3 μ m)	Supercoil
pGEMT-1	3.5 (1.2 μ m)	Open Circle / Supercoil
pGEMT-2	3.5 (1.2 μ m)	Open Circle / Supercoil
XLU2	2.0 (0.67 μ m)	Open Circle / Supercoil

1.2 DNA 样品的辐照方案

选择 ^{241}Am 源的 $E=5.48\text{MeV}$ 、 $\text{LET}=90\text{keV}/\mu\text{m}$ 的 α 粒子对水溶液中的 DNA 样品进行辐照。图 2 是实验使用的 ^{241}Am - α 源辐照装置的示意图。 ^{241}Am 面源紧贴在光栏的下表面并被适当固定。光栏的上表面固定一层 $5\mu\text{m}$ 厚的洁净 Mylar 膜。事先测定 ^{241}Am - α 源的活度为 2400counts/s 。在源活性面和光栏之间插入一片 $100\mu\text{m}$ 厚的纸片,作为控制辐照时间长度的快门,以控制辐照剂量。 5.48MeV 的 α 粒子在水中的射程为 $38\mu\text{m}$,为使 α 粒子能照射到整个厚度的样品层,将 DNA 样品溶液夹在表面具有微米级平整度的 Mylar 膜和云母片之间,形成厚度为 $30\text{—}40\mu\text{m}$ 的水层,使其接受均匀照射。有机玻璃封罩的作用是防止液体挥发,并保持样品溶液清洁。将辐照后的样品溶液提取至离心试管内稀释,然后沉积到经过修饰的云母片表面。

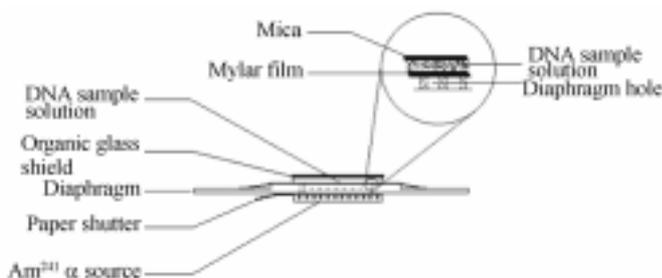


Fig.2 Sketch map of Am^{241} - α source device for DNA sample radiation

1.3 DNA 样品的吸附

对生物大分子样品作 AFM 观测,其样品制备的关键是以适当的结合力将生物大分子固定在一个原子级平整的衬底表面上。云母片是公认容易获得的理想材料。然而,新解离的云母片表面略呈负电性,DNA 分子表面也带有负电荷,由于静电斥力,样品不易被吸附到云母表面。

目前用得最多的吸附方法,是使云母片表面硅烷化,使其表面呈正电性,以利于 DNA 分子的吸附^[3-5]。其中,APTES(3-aminopropyl triethoxysilane, 或为 APS, 3-氨基丙基三乙烷基硅烷)硅烷化法经不断改进,已日趋成熟。该方法在衬底表面形成的有机单分子膜,能在几个 μm^2 的范围内保持了其原子级的平整度,有利于 AFM 成像^[6]。

DNA 样品的吸附过程如下:在室温下,用移液器吸取去离子重蒸水及 DNA 样品溶液,按一定比例混合后,配制成 DNA 样品溶液,放入离心试管内振荡;用移液器取一定量稀释后的 DNA 溶液,缓缓滴在 APTES-云母表面上;用干净平整的封口膜 (Para Film) 将液滴覆盖,赶除气泡,静置 $3\text{—}5\text{min}$,样品吸附即告完成。最后,揭开封口膜,吸取少量重蒸水冲洗衬底表面若干次,再用干净空气或氮气将衬底表面的剩余水分吹干,或使其自然干燥,完成样品制备^[7]。

2 DNA 的 AFM 观测

在室温大气环境中,用 Nanoscope III AFM (美国 DI 公司)对 3 种质粒 DNA 进行 Tapping Mode 观测。图 3 是对 DNA 分子 p-HAZE 的扫描图像。扫描范围 $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$,显示高度(与图像灰度级别相对应的高度值,灰度由浅到深,高度递减) $0\text{—}5\text{nm}$,样品浓度为 $5\text{ng}/\mu\text{L}$ 。图 3a 显示一条长约 $3.3\mu\text{m}$ 的分子链的一部分,图 3b 是该分子链在图 3a 右下方的延伸。由于制样时 APTES 云母衬底的

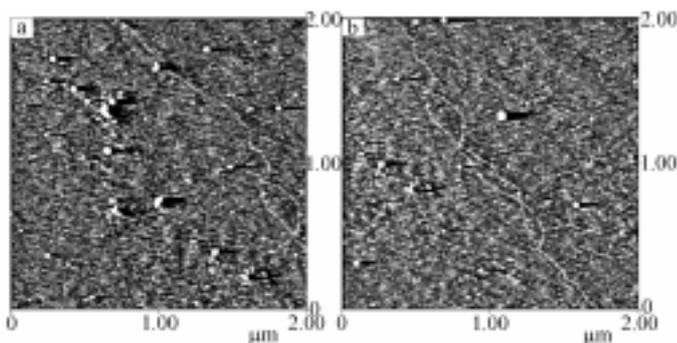


Fig.3 AFM topography image of p HAZE molecules deposited on APTES-Mica surface

表面吸附了样品溶液中残留的蛋白质等少量杂质，视野中能看到直径为几十 nm 的白色颗粒。

图 4 是图 3a 的离线分析剖面图。DNA 分子的双螺旋直径为 2.3nm，而实验中取样点（白色箭头所示）处 DNA 链的表观宽度（Surface distance 所示）为 15.6nm。这种现象在 AFM 的生物样品实验中被称为针尖的展宽效应，由以下公式估算：

$$W = 4\sqrt{rR}$$

式中， W 是 AFM 图像的样品表观宽度， r 是样品半径， R 是针尖的曲率半径^[8]。本次实验使用的 TESP（美国 DI 公司）及 NSC12（俄罗斯 NT-MDT 公司）Tapping Mode Tip 针尖的曲率半径均为 10nm。

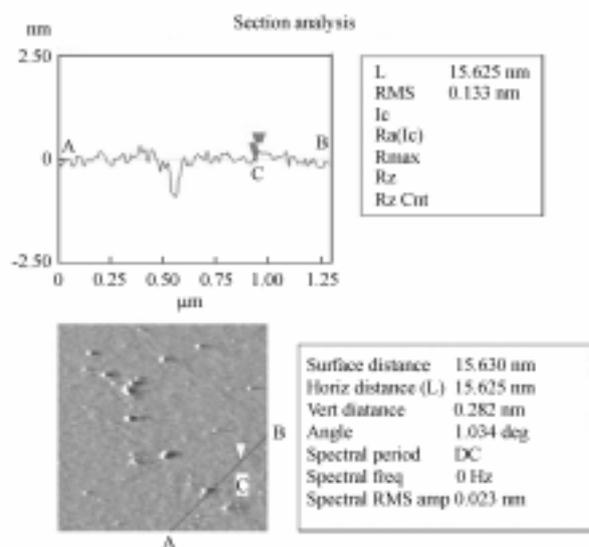


Fig.4 Section analysis of the topography image of ρ -HAZE molecules

图 5a 是平均长度为 1.2 μ m 的 pGEMT-2 分子的 AFM 形貌图。扫描范围 3 μ m \times 3 μ m，显示高度 0—3nm，制样浓度为 10ng/ μ L。在整个扫描范围内，共可看到约 60—70 条 DNA 链。其中一个现象是大多数分子呈线性或 U 形超螺旋形态，且 U 形开口朝向大致相同。生物大分子发生这种有序排列现象的成因，下文将加以讨论。图 5b 是直接吸附于纯云母表面的 pGEMT-2 样品，扫描范围 3 μ m \times 3 μ m，显示高度 0—2nm，制样浓度为 10ng/ μ L。由于静电斥力，纯云母对 DNA 分子的吸附能力较差^[9]，仅少数分子能够被吸附。所以在相同的制样浓度下，图 5b 中衬底表面的分子密度明显小于图 5a 中的分子密度。同时，衬底对分子的“静电”束缚力很小，分子易发生形变^[10]。云母衬底上的 DNA 分子两端明显发生卷缩，有些分子完全缩成了一团。另一个原因可能是由于制样时溶液中存在少量阳离子吸引表面带负电的 DNA 分子，使分子在附着于云母表面时发生

形态改变^[11]。图 5c 是较小的 XLU2 分子的 AFM 图像，DNA 链平均长度为 670nm，扫描范围 3 μ m \times 3 μ m，显示高度 0—2nm，制样浓度 5 ng/ μ L。

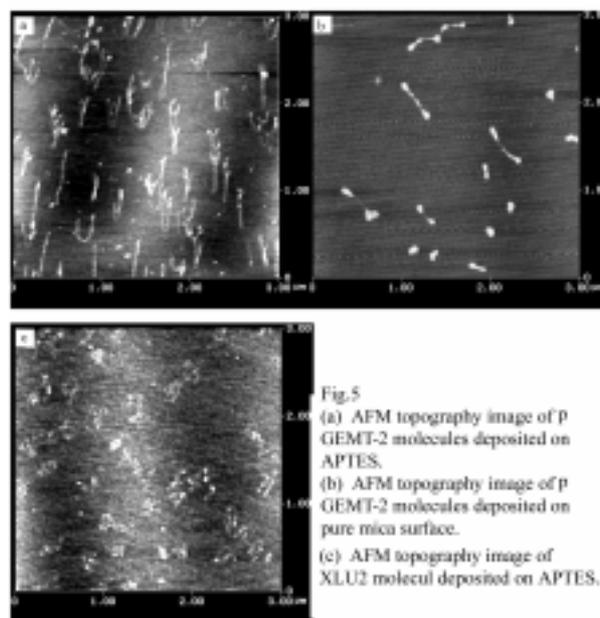


Fig.5
(a) AFM topography image of pGEMT-2 molecules deposited on APTES.
(b) AFM topography image of pGEMT-2 molecules deposited on pure mica surface.
(c) AFM topography image of XLU2 molecule deposited on APTES.

图 6 为 5.48MeV 的 α 粒子辐照前后的 pGEMT-1 的 AFM 图像。图 6a 为辐照前的对照样品图像。扫描范围 2 μ m \times 2 μ m，显示高度 0—2nm。由于制样时 DNA 溶液浓度较大，部分 DNA 分子之间发生重叠。图 6b（扫描范围 4 μ m \times 4 μ m，显示高度 0—2nm）和图 6c（扫描范围 2 μ m \times 2 μ m，显示高度 0—2nm）为经 1.0Gy α 粒子辐照后 AFM 图像。由此两图像可见：虽然大部分分子仍保持完整的原始形态，但低剂量的 α 粒子辐射仍可导致少量的 DNA 分子出现 DSB 现象，环状的 DNA 链明显断开（长箭头所示）。图

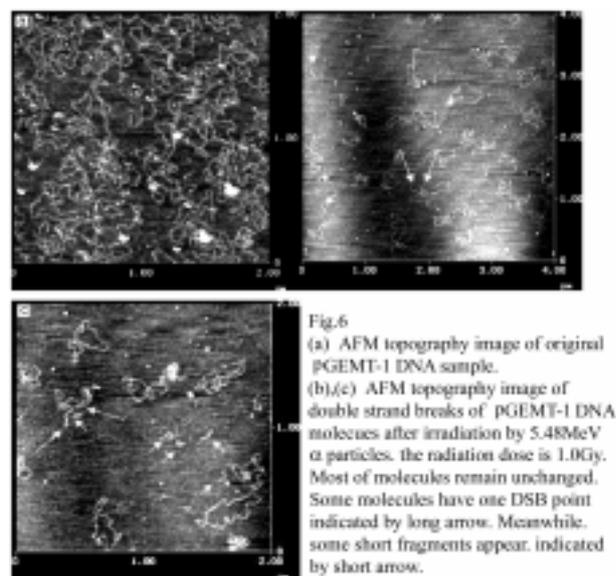


Fig.6
(a) AFM topography image of original pGEMT-1 DNA sample.
(b),(c) AFM topography image of double strand breaks of pGEMT-1 DNA molecules after irradiation by 5.48MeV α particles, the radiation dose is 1.0Gy. Most of molecules remain unchanged. Some molecules have one DSB point indicated by long arrow. Meanwhile, some short fragments appear, indicated by short arrow.

像中还可以见到长度为几十 nm 的小分子碎片(短箭头所示),这是在同一个 DNA 分子上发生 DSB 的两个位点相隔距离非常接近时形成的。

3 讨论

在图 5a 中,大多数分子链在同一方向上呈线性排列。这可能是在样品制备过程中形成的。用封口膜盖住 APTES-云母衬底上的样品溶液时,为赶出液体中的气泡,须将剪切成正方形的封口膜倾斜,使其一侧轻轻的贴着衬底表面移动。在液体表面张力的作用下,含有 DNA 样品的液滴会跟随封口膜在衬底表面移动一小段距离,等气泡被赶出后再将封口膜平放在衬底上。在这一过程中,DNA 分子在吸附完成之前会随着水流沿着有纳米级起伏的衬底表面被拖动,导致大部分超螺旋和开环分子在通过衬底上的狭缝时被挤压、拉直呈线性形态^[3]。而另一部分开环分子则由于分子链中部被衬底上的微小突起阻挡,而呈现开口方向相同的 U 形形态^[12]。可以看到,两种形态的 DNA 分子排列方向相当一致。利用类似的方法能够实现 DNA 等链状分子实施人工操纵,从而改变其构型^[13]。

根据我们用 AFM 观测 DNA 样品的经验,如严格控制样品制备和吸附过程中的各个步骤,便能在小于 $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ 的扫描范围内,重复得到不同形态 DNA 分子链的清晰图象,以及其受重离子辐照而致的双链断裂碎片的清晰图像。这就为进一步利用 AFM 开展对 DNA 分子各项物理性质,包括研究电离辐射导致 DNA 双链断裂的机制奠定了基础。

目前,利用 AFM 技术观测 DNA 分子长度的系统误差能达小于 1% 的精度。我们进一步的实验目标,是获得 DNA 分子受到不同剂量的重离子辐照后,双链断裂碎片的平均长度分布率。为得到有统计意义的实验结果,设计方案主要考虑到以下几方面。首先,选择长度合适的 DNA 样品。对于 DNA 分子,观测范围在 $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$ 左右时 AFM 图像具有最佳分辨率,所以太长或太短的 DNA 样品都不适合进行长度分布统计。第二,配制合理的样品溶液浓度。这与衬底上的分子沉积面密度直接相关。密度太大会导致分子间距太小,造成部分样品发生重叠,不利于区分;密度太小则一个扫描视野内可观测样品的数量太少,观测效率降低。此外,对于不同种类的电离辐射,可在制样时用酶标等分子生物学方法寻找 DNA 碱基序列中易发生双链断裂的敏

感位点。这将使得在分子水平上实时地跟踪和研究 DNA 结构变化所引起的基因突变等生物学效应,成为可能。

致谢 北京军事科学研究所放射毒理实验室的周平坤研究员提供大肠杆菌质粒 DNA 样品;中国科学院上海应用物理研究所的胡钧教授提供制样所需的 APTES-云母衬底;中国科学院物理所的韩宝善研究员为我们提供一部分 NanoscopeTM AFM 的观测机时,在此一并表示感谢。

参考文献

- 1 白春礼,田芳,罗克等.扫描力显微术,北京:科学出版社,2000.249-251
BAI C L, TIAN F, LUO K *et al.* Scanning Force Microscopy, Beijing: Science Press, 2000. 249-251
- 2 Pang D, Popescu G, Rodgers J *et al.* Scanning Microscopy, 1996, **10**(3-4)
- 3 HU J, Wang M, Weier H U G *et al.* Langmuir, 1996, **12**(7): 1697-1700
- 4 Lyubchenko Y, Gall A A, Lindsay S M *et al.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1992, **10**: 589-606
- 5 Lyubchenko Y L, Oden P I, Lampner D *et al.* Nucleic Acids Research, 1993, **21**: 1117-1123
- 6 Lindsay S M. Scanning Probe Microscope in Biology, [Http://green.la.asu.edu/review/](http://green.la.asu.edu/review/)
- 7 袁明秀,张志宏,洪伟.高技术通讯,2000,1-4
YUAN Mingxiu, ZHANG Zhihong, HONG Wei. High-tech Communication, 2000, 1-4
- 8 WU X, LIU W, LI M *et al.* Science In China (Series C) (China), 1997, **40**(5A): 200-203
- 9 陈圣福,韩公社,阎隆飞等.核技术,1996, **22**(6): 354-357
CHEN Shengfu, HAN Gongshe, YAN Longfei *et al.* Nucl Tech, 1999, **22**(6): 354-357
- 10 Karsten Rippe, Norbert Mücke, Jörg Langowski. Bioforum International, 1997, **1**: 42-44
- 11 Rivetti C, Guthold M, Bustamante C. Journal of Molecular Biology, 1996, **264**: 919-932
- 12 Bensimon A, Simon A, Chiffaudel *et al.* Science, 1994, **265**: 2096-2098

13 HU J, ZHANG Y, GAO H *et al.* Nanoletters, 2002, 2(1): 55-57

AFM observation of DNA molecules and their double strand fragments broken by α -particles

NI Meinan¹ ZHAO Kui^{1,2} SUI Li¹ MEI Junping^{1,3} GUO Jiyu¹ WANG Ruyu⁴

¹(China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413)

²(The Key Laboratory of Beam Technology and Material Modification of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875)

³(Hebei University of Technology, Tianjin 300130)

⁴(Institute of Physics and Chemistry Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

ABSTRACT DNA, the carrier of bio-information, is the most important target molecule in radiobiology. In order to understand the DSB mechanism of DNA molecules induced by ionizing radiations, the structure and property of DNA molecule and its DSB fragment shall be studied. In this paper, three kinds of purified DNA molecules were observed by Tapping Mode AFM in atmosphere. One kind of the DNA molecules in water solution was irradiated by ²⁴¹Am- α source irradiation device. Intuitive images of the molecules and DSB fragments were obtained. By this way, further study of statistic model of probability of the DSB of DNA molecules induced by various radiations, especially heavy ions, could be carried out.

KEYWORDS DNA, AFM, Bio-sample Adsorption, AFM Tip Broadening Effect, Double Strand Breaks

CLC Q6-33, Q691.5