

原子力显微镜观测并切断在 Si 表面拉直的 DNA 分子

李辉 韩宝善*

(中国科学院物理研究所磁学国家重点实验室, 北京 100080. * 联系人, E-mail: bhan@aphy.iphy.ac.cn)

摘要 DNA 具有稳定的线性结构和一定的导电性能, 因而有可能作为纳米导线来构成纳米器件. 为此, 人们已经采用很多方法尝试以 DNA 为基础单元构成纳米图型. 用原子力显微镜观察自由液流法在 Si 表面拉直的 λ -DNA 分子, 观察到加二次液流后 λ -DNA 形成的悬链线状结构和交叉的 DNA 网络, 并成功地用原子力显微镜针尖切断在 Si 表面拉直的 λ -DNA 分子.

关键词 λ -DNA 原子力显微镜 拉直 悬链线状结构 切断

DNA 分子不仅作为基因信息的载体在生物学上有重要的研究价值, 并且可能用作纳米器件的基本构成单元而引起广泛的研究兴趣. DNA 分子稳定的线性结构及其一定程度上的导电性^[1,2], 使人们设想可用 DNA 分子作为分子导线来连接人造和天然的纳米器件^[3,4]. 达到此目标的一个前提是能够在纳米尺度上操纵 DNA 分子来构建我们设想的纳米图型, 因此单个 DNA 分子的操纵已成为近年来研究的一个热点^[5~7].

由于提纯的 DNA 分子在缓冲液中处于团聚的状态, 因此, 首先要在平整的固体基片表面拉直 DNA 分子. 一些拉直 DNA 分子的方法, 如分子梳、动态分子梳和离心法等已经取得较好的结果^[2]. 但这些方法使用的基片主要为经过化学修饰的云母或金单晶^[2,8,9], 而在已有成熟加工技术和大规模应用的 Si 表面上的研究却不多^[10]. 本文用自由液流的方法在 Si 表面拉直 λ -DNA 分子, 并且用二次液流的方法形成了纳米尺度的悬链线状结构和交叉的 DNA 分子网络.

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)不仅是纳米尺度表征的强有力的工具, 而且是纳米尺度上进行单分子操纵的一种手段^[11]. 在结构生物学领域, AFM 广泛用于观察 DNA、蛋白质和生物膜等^[12,13]. 在用 AFM 操纵生物大分子方面也进行了有成效的尝试^[14]. 本文不仅用 AFM 来观察 Si 表面拉直的 DNA 分子和二次液流形成的悬链线状结构, 还成功地用 AFM 定点切断拉直的 DNA 分子.

1 材料和方法

(i) 材料. 从感染的 *E.coli* 菌株 W3350 中提取的 λ -DNA(516 ng/ μ L)购自北京华美生物工程公司.

分子量为 48502 bp, 长度约 16 μ m. 原溶液浓度约为 200 μ g/mL. 储藏缓冲液为 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA. 使用前保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中.

P-型 Si 片表面为(111)面, 使用前用乙醇清洗. 分析纯的商品乙醇(>99.7%)用来稀释原始的 λ -DNA 溶液.

(ii) Si 表面拉直 DNA 的方法. λ -DNA 首先用乙醇稀释到合适的浓度, 一般为 2 ng/ μ L. 1 cm² 的 Si 片和水平面成 45 $^{\circ}$ 倾斜放置. 用微量移液器取 5 μ L 稀释后的 λ -DNA 滴在片的上端, 液滴在重力作用下向下流动. 空气中放置 3~5 min, 等待乙醇完全挥发后, 用 AFM 进行观察.

二次液流法是将已吸附有 DNA 的 Si 片旋转 90 $^{\circ}$ 放置, 取 5 μ L 乙醇沿着垂直于已拉伸 DNA 分子的方向流下, 这样形成的是 λ -DNA 的悬链形结构. 但如果二次液流用的是无水乙醇稀释的 DNA 溶液, 则会形成交叉的 DNA 网络.

(iii) AFM 成像. AFM 实验用 Digital Instruments 公司的 Nanoscope III a-Multi-Mode AFM. 实验在空气中 Tapping 模式下进行. 使用俄罗斯 NT-MDT 公司生产的 NSC12 Si 针尖, 谐振频率约为 106 kHz.

(iv) 切断拉直的 DNA. 切断拉直的 DNA 分子需要采用 Tapping/Lift 模式, 即运用 2 次扫描, 第 1 次扫描测得样品表面形貌图, 第 2 次扫描则在一定高度(lift height)下进行, 从而探测出长程的作用力(磁力、静电力等). 切断 DNA 时, 先扫描单根 DNA 分子, 逐步将扫描减小到 12 nm $\times$ 100 nm, 然后打开 Lift 模式, 把针尖提升高度设置为负值(一般为-10 nm), 扫描 2~3 遍后关闭 Lift 模式, 恢复正常扫描.

2 实验结果

2.1 拉直的 DNA 分子

要观察拉直的 DNA 分子, 首先需要表面平整度很高的固体基片. 我们选择 P-型的 Si(111)表面, 其表面的方均根粗糙度小于 0.1 nm, 满足我们的实验要求.

一开始, 尝试使用缓冲液来稀释 DNA 分子, 但由于 Si 片表面本身的疏水性, 包含 DNA 分子的液滴在 Si 表面不能扩散, 而是保持液滴的形状沿 Si 片滚下, DNA 分子不能吸附在 Si 片上. 后来改用无水乙醇稀释 DNA 分子. 乙醇液滴沿 Si 片表面流下时扩散开来, 使其中包含的 DNA 分子随液流而拉直, 并吸附在 Si 片上.

图 1(a)的典型形貌图示出了 Si 片表面上拉直的 DNA 分子, 图中几根拉直的 DNA 是从左下角发散开来形成的. 用截面分析测量其高度为 0.8 ~ 1.5 nm 不等, 参考以前文献的数据^[15], 我们认为图上高度较低的约为 0.8 nm 的线为单根的 DNA 分子, 而高度较高的约为 1.2 ~ 1.5 nm 的线应该是两根缠绕在一起的 DNA 分子束(bundle). 从实验测得的多幅拉直 DNA 分子的形貌图上可以看出, 大部分 DNA 分子或分子束的长度大于 10 μm , 这与 λ -DNA 的原始长度是相仿的, 说明用无水乙醇稀释的 DNA 吸附在 Si 片上不会导致 DNA 分子的断裂.

我们发现实验中很难将全长的 λ -DNA 分子用自由液流的方法平行地拉直, 只有在小至 2 μm 的扫描范围内, 譬如图 1(b)所示, 3 根拉直的 DNA 分子才几乎平行. 另外, 还尝试了用超声把乙醇稀释后的

λ -DNA 分子振荡 10 min, 再把它们用前面描述的方法在 Si 片上拉直, 典型的结果示于图 1(c). 由图可见, 打断了 DNA 分子的排列较为规则, 长度多为 1 ~ 2 μm , 说明超声振荡的方法的确可以打断 DNA.

2.2 二次液流形成的悬链线状结构和交叉的 DNA 网络

为了形成 DNA 的网络结构, 需要用二次液流沿垂直于已拉伸的 DNA 的方向流过. 我们首先尝试用不含 DNA 的无水乙醇作二次液流, 结果看到了图 2(a)所示的典型的悬链线状结构. 文献[16]对二次液流导致 APTES-云母表面吸附的单分子 DNA 形成的悬链线状结构进行了细致的分析, 并用经典弹性力学的方法做了定量描述. 图 2(a)中的悬链线状结构与文献[16]描述的结构有所不同: 文献[16]描述的 DNA 链仍有部分片段保持它们没有变形的拉直状态, 而图 2(a)没有. 我们认为差别的原因在于 DNA 在 APTES-云母表面与在 Si 片表面上的吸附行为有所不同. DNA 分子在 APTES 膜表面的吸附是静电吸引的结果, 所以吸附非常牢固, 事实上, 文献[16]描述的结构需要用一定速度的液流并保持数分钟才能形成. 而在我们的实验中, 图 2(a)所示的悬链线状结构容易形成, 表明 DNA 在 Si 表面的吸附比较松散, 这种吸附的力学机制尚不清楚, 还需要进一步研究.

用 2 ng/ μL 的 DNA 乙醇溶液的二次液流, 得到如图 2(b)所示的结构. 我们可以认为 DNA 分子 1 是一次液流吸附在硅片上, 并随着二次液流的流动形成悬链状的弯曲结构; 而 DNA 分子 2 是在二次液流中吸附上的, 因而保持了很好的拉直状态. 如果要形

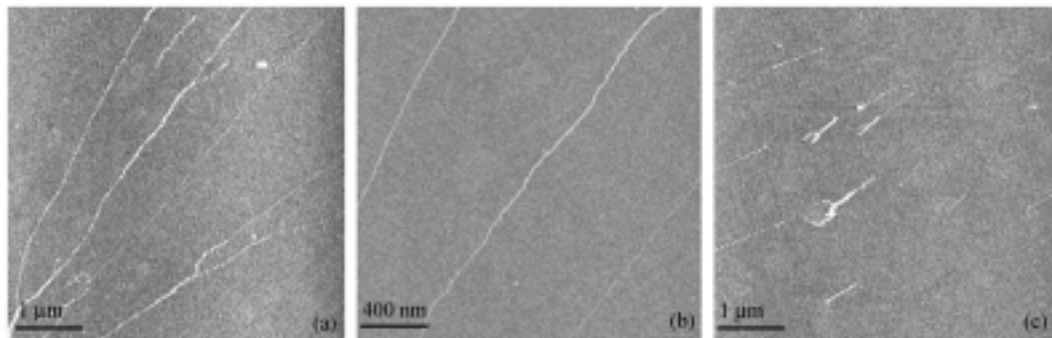


图 1 在 Si 片表面拉直 DNA 分子的 AFM 形貌图

(a) 5 μm 扫描范围的典型的形貌图, 说明 DNA 已经被拉直. (b) 2 μm 扫描范围典型的形貌图, 说明在此范围内 DNA 几乎平行地拉直了. (c) 稀释后的 DNA 经超声振荡后吸附的结果, DNA 分子已明显变短, 说明超声会导致 DNA 分子的断裂. 色标均为 5 nm

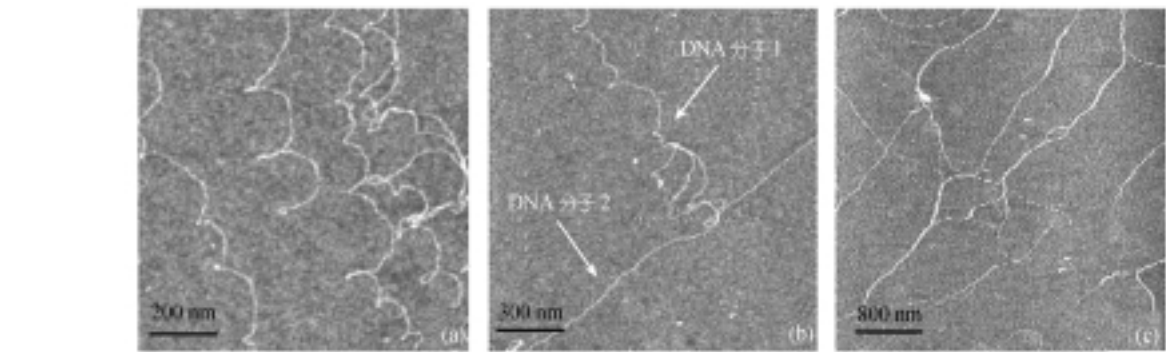


图 2

(a) 二次液流用无水乙醇沿垂直于已拉直的 DNA 的方向流下而形成的悬链状结构. (b) 二次液流用乙醇稀释的 DNA 溶液形成, DNA 分子 1 是第一次液流吸附上的, 二次液流导致其形成悬链线状结构, 而 DNA 分子 2 是二次液流拉直吸附上的. (c) 减小吸附时 Si 片与水平面的角度, 二次液流形成的 DNA 网络结构, 示出 DNA 分子的取向大体上是沿两个对角线方向

成较好的 DNA 网格结构, 需要减小二次液流对第一次吸附的 DNA 分子造成的影响.

为了减小二次液流形成的悬链线, 我们减小吸附时 Si 片与水平面的角度, 从而减小了二次液流流动的速度, 初步得到了由图 2(c)所示的交叉 DNA 网络, 其中 DNA 分子大体上是沿两个对角线方向排列, 对应于一次和二次液流的方向. 但是 DNA 分子的取向还是比较杂乱, 要得到排列整齐的 DNA 网格结构, 还需要进一步的努力.

2.3 用 AFM 针尖切断拉直的 DNA 分子

操纵单分子 DNA 对其进行加工是构建 DNA 纳米结构的另一个主要手段. 在这里我们尝试了用 AFM 针尖来切断 Si 表面拉直的 DNA 分子. 图 3 示出了用 AFM 针尖依次在 3 个不同位置切断 DNA 分子的系列形貌图. 与切断前的图 3(a)相比, 在图 3(b)~(d)的第一个断口左侧出现一个原来并没有的颗粒,

我们认为这是在切断过程中形成的. 值得指出的是, 在切断中由于针尖上黏附了一些杂物, 增大了针尖的展宽效应, 从而使图 3(b), 特别是图 3(c), (d)中的 DNA 分子明显变粗. 除此之外, 3 个断口的形状和大小都基本一致, 它们的细节结构示于图 4(a). 这说明我们的方法可以很好地对单根 DNA 分子进行定点的切断, 重复性好. 图 4(b)是图 4(a)中黑线上的截线图. 从图上可以看出, 断口呈倒三角的凹陷, 其半宽度(两个倒三角之间的距离)为 12 nm. 断口凹陷的深度为 0.8 nm, 即为测得的 DNA 的高度, 所以可以认为断口处的 DNA 已被完全切断.

从图 4(a)上还可以看到, DNA 断口从右向左有一点延伸, 实际上这是由实验中针尖由右向左扫描(retrace)而导致的.

3 结论

我们用自由液流法将无水乙醇稀释的λ-DNA 分

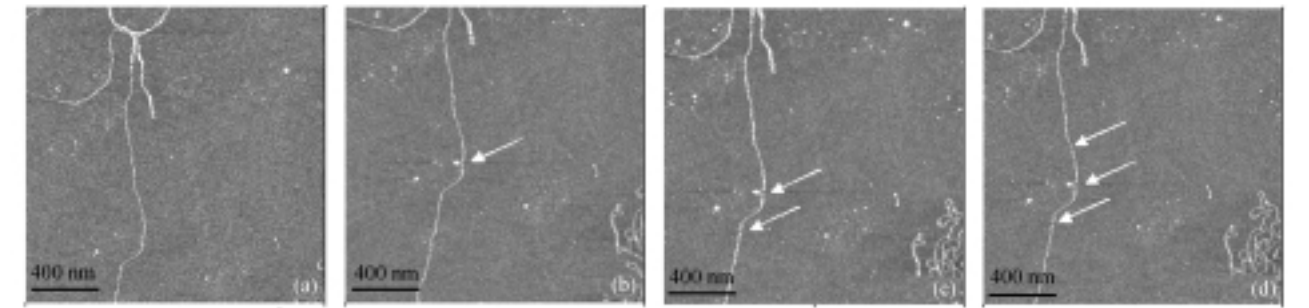


图 3 用 AFM 针尖依次在 3 个不同位置切断 DNA 分子的系列形貌图

(a) 切断前的 DNA 分子, (b)~(d)分别用 AFM 针尖依次在 3 个不同位置切断后的 DNA 分子图像, 箭头所指为切断的位置

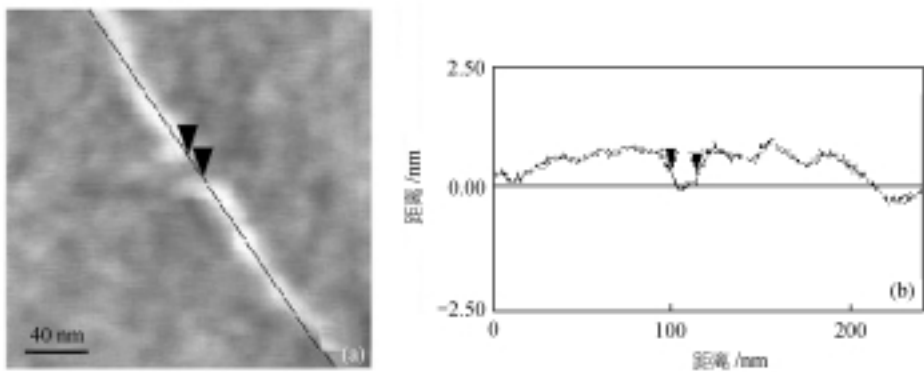


图 4

(a) DNA 被切断位点的 200 nm 的原子力显微镜形貌图. (b)示(a)上黑线所示位置的截线图, 箭头所示为切断位点的两个边缘

子拉直吸附于 Si 片表面, 用 AFM 观察了拉直的结果. 用超声将 λ -DNA 分子打断成长度约 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的片段具有更好的拉直吸附的效果. 发现了二次液流能导致拉直的 DNA 形成悬链线状结构, 并构筑了交叉的 DNA 二维网络. 我们还成功地用 AFM 针尖定点切断了拉直的 DNA 分子, 重复性好. 以上结果为在纳米尺度上控制和操纵 Si 表面吸附的 DNA 分子, 构建纳米结构提供了一些经验.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G199801-0102).

参 考 文 献

1 Porath A, Bezryadin A, Vries S, et al. Direct Measurement of electrical transport through DNA molecules. *Nature*, 2000, 403: 635~637

2 Cai L, Tabata H, Kawai T. Probing electrical properties of oriented DNA by conducting atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2002, 12: 211~216

3 Niemeyer C M, Progress in “engineering up” nanotechnology devices utilizing DNA as a construction material. *Applied Physics A*, 1999, 68: 119~124

4 Rakitin A, Aich P, Papadopoulos C, et al. Metallic conduction through engineered DNA:DNA nanoelectronic building blocks. *Physical Review Letters*, 2002, 86: 3670~3673

5 Cai L, Tabata H, Kawai T. Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity. *Applied Physics Letters*, 2000, 77: 3105~3106

6 Ouyang Z Q, Hu J, Chen S F, et al. Molecular patterns by

manipulating DNA molecules. *J Vac Sci Technol B*, 1997, 15: 1385~1387

7 Hu J, Zhang Y, Gao H, et al. Artificial DNA patterns by mechanical nanomanipulation. *Nanoletter*, 2002, 2: 55~57

8 张益, 陈圣福, 欧阳振乾, 等. 单个 DNA 分子的拉直操纵和成像. *科学通报*, 2000, 45(5): 490~493

9 Wang H D, Tang Z Y, Li Z, et al. Self-assembled monolayer of ssDNA on Au(111) substrate. *Surface Science Letters*, 2001, 480: 389~394

10 Arai T, Tomitori M, Saito M, et al. DNA molecules sticking on a vicinal Si(111) surface observed by noncontact atomic force microscopy. *Applied Surface Science*, 2002: 188: 474~480

11 Junno T, Deppert K, Montelius L, et al. Controlled manipulation of nanoparticles with an atomic force microscope. *Applied Physical Letters*, 1995, 66: 3627~3629

12 Hansma H G. Varieties of imaging with scanning probe microscopes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14678~14680

13 Dufrene Y F, Lee G U. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1509: 14~41

14 Oesterhelt F, Oesterhelt D, Pfeiffer M, et al. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science*, 2000, 288: 143~146

15 Li G L, Zhang Y, Li B, et al. Fine structure of DNA Bundles:atomic force microscopy study. *Japanese Journal Applied physics*, 2001, 40: 1330~1332

16 Wu S Y, Zhang Y, Lei X L, et al. The catenary-like nano-patterns of individual DNA molecules constructed by liquid flow manipulation. *Chinese Physics(in Chinese)*, 2002, 51: 1887~1891

(2002-10-24 收稿, 2003-01-20 收修改稿)