

基于原子力显微镜抬高模式的 DNA 分子高度测量

郭云昌^① 周星飞^{①②} 孙洁林^{③*} 李民乾^① 胡 钧^{①③}

(^① 中国科学院上海应用物理研究所单分子探测与单分子操纵实验室, 上海 201800; ^② 宁波大学物理系, 宁波 315211; ^③ 上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心, 上海 200030. * 通讯作者, E-mail: jlsun@sjtu.edu.cn)

摘要 在传统的轻敲模式原子力显微镜基础上利用抬高模式对 DNA 分子的高度进行了测量研究. 通过不断抬高针尖高度, 逐步减小针尖对样品的作用力, 以测量软样品的形变量, 并通过记录针尖的抬高高度来计算 DNA 分子的高度. 实验中利用抬高模式测得的 DNA 分子高度为 1.5 ± 0.2 nm, 而传统轻敲模式下测得的 DNA 分子的高度为 0.8 ± 0.2 nm, 表明针尖对 DNA 的作用力是导致传统轻敲模式测得 DNA 分子高度较低的重要因素. 同时本文采取的方法也适用于测量其他软样品的高度.

关键词 抬高模式 原子力显微镜 抬高扫描高度 弹性形变 高度测量

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是利用针尖与样品间的相互作用力进行样品表面的成像以及对样品表面相关局域性质的研究. 它通常有接触(contact)、非接触(non-contact)和轻敲(tapping)三种模式. 轻敲模式原子力显微镜(tapping mode atomic force microscopy, TMAFM)在空气中测得的双链DNA分子的高度在大多数情况下只有 $0.7 \sim 0.8$ nm^[1~8], 远远低于目前普遍接受的DNA双链分子的直径值 $2 \sim 2.2$ nm^[9], 在TMAFM成像模式下, 针尖只有在很靠近样品表面时才能稳定成像, 造成了针尖对样品的压力比较大, 因而使得柔软样品的表面发生较大的压力形变. 在前期工作中, 我们利用振动模式扫描极化力显微镜(vibrating mode scanning polarization force microscopy, VSPFM)^[10]对DNA分子的高度进行测量, 采取了外加电场的方法. 实验中, 在针尖上加了交流电压, 使针尖与样品间建立了极化力电场, 产生极化力, 减小了针尖对DNA分子的作用力. 测得的DNA分子的高度远大于传统TMAFM测得的DNA分子的高度, 说明传统TMAFM对DNA分子成像时, 由于针尖的作用力, 使DNA分子发生了较大的形变.

原子力显微镜抬高模式(lift mode AFM, LMAFM)技术在用于测量远程力(例如磁力和电场力等)成像的实验中, 可以方便地将样品的磁力或电场力图像与样品的形貌像相区分^[11]. 本文利用LMAFM与常规的TMAFM相结合, 不需添加任何外部设备, 常规条件下就可以在大气和液体环境下测量DNA分子的高度. 在实验中不断抬高针尖高度, 针尖对样品的作

用力逐步减小, 恢复 DNA 分子的弹性形变量, 并通过记录针尖的抬高高度来计算 DNA 分子的高度.

在抬高模式中(图1所示), 系统先进行一次标准的来回扫描, 然后再执行第二次来回扫描, 在第二次扫描的时候, 针尖首先抬高到抬高起始高度(lift start height), 然后移到抬高扫描高度(lift scan height). 抬高起始高度大, 可以将针尖从样品表面推开并克服粘性. 抬高扫描高度是针尖的最终高度. 利用LMAFM, 在传统轻敲模式的基础上, 我们打开隔行扫描(interleave mode), 在抬高模式中, 逐渐提升针尖的高度, 使针尖逐渐远离 DNA 分子. 因为 DNA 分子是具有弹性的, 所以在针尖逐渐抬高的过程中, DNA 分子就会逐渐恢复其原有的高度, 即恢复由于针尖作用造成的 DNA 分子的可逆形变量. 这样可以从针尖的抬高高度中推算出在 LMAFM 下 DNA 分子的实际高度.

实验研究表明, 在利用传统 TMAFM 对 DNA 分子等软样品的高度测量中, 针尖的作用力是引起 DNA 分子高度变低的一个非常重要的因素, 同时本方法也对利用 VSPFM 测量得到的 DNA 分子高度数据提供了实验验证.

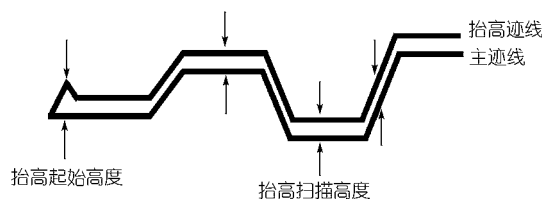


图 1 抬高模式示意图

1 材料和方法

实验中全部采用 λ DNA样品(上海华美生物有限公司), 初始浓度为 350 ng/ μ L, 在 -20°C 下储存, 使用时稀释成 10 ng/ μ L. 将新解理的云母粘在一个旋转的圆盘上, 依次加入 10 μ L去离子双蒸水、10 μ L 1 mM $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(分析纯)和 10 μ L 10 ng/ μ L的DNA溶液^[12], 1000~6000 转/s旋转 30 s, 然后再在云母上滴加 10~20 μ L去离子双蒸水, 1000~6000 转/s旋转 60 s, 制成待测样品.

所有的图像都是用美国DI公司的 NanoScope III a AFM采集(Multi-mode Scanning Probe Microscopy III a, Digital Instruments/Veeco, Inc., Santa Barbara, CA). 实验时, 样品的温度保持在 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$, 相对湿度控制在 20%~30%. 扫描管选用了两种型号: AS-12(10 $\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}\times 2.5\mu\text{m}$)和 AS-130(125 $\mu\text{m}\times 125\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$), 实验中用到了两种针尖, 分别为 Mikromasch 的 NSC11 和 NSC12(弹性系数分别为 48 N/m 和 14 N/m).

首先利用传统的TMAFM对DNA分子进行高度成像, 成像时尽量增加设置点(Amplitude setpoint, Asp), 减小针尖和样品之间的相互作用力, 使系统实现在最小的作用力下稳定成像. 打开隔行扫描(interleave scan), 激活抬高模式(lift mode). 然后关闭隔行扫描中的反馈, 在主扫描(main scan)中采集高度图像, 而在隔行扫描中采集振幅图像. 逐渐增加抬高扫描高度(lift scan height), 衬底表面由清晰逐渐变为模糊, 直至DNA分子的轮廓也变为模糊. 记录衬底表面开始消失时的抬高扫描高度值 H_{subs} 和DNA分子轮廓开始全消失时的抬高扫描高度值 H_{DNA} , 这两个高度差反映了针尖抬高过程中DNA分子恢复的可逆形变量, 如图(1)式所示.

$$\Delta H = H_{\text{DNA}} - H_{\text{subs}}, \quad (1)$$

利用实验仪器提供的离线分析软件(DI offline software)中的截面分析功能(section analyse)可以测得此时主扫描中正常TMAFM下的DNA分子高度 H_0 . 这样DNA分子的实际高度可以表达为正常TMAFM下的DNA分子高度与在针尖抬高过程中DNA分子恢复的可逆形变量之和, 即(2)式

$$H = H_0 + \Delta H. \quad (2)$$

实验中如何准确判断衬底和DNA分子的反差开始消失是影响DNA分子高度测量的一个重要环节. 在针尖抬高过程中, 在针尖抬高到某个高度 H_i

时, 此时图像的粗糙度为 RMS_i (root-means-squared, RMS), 在测量RMS值时, 应当选取不包括DNA分子在内的所有区域, 定义零范围扫描时图像的RMS值为 RMS_0 , 如果满足 $\text{RMS}_i \leq \text{RMS}_0$, 我们认为衬底的反差就已经完全消失. 以 H_i 为零起连续计算提高过程中的 RMS_i 值, 第一个满足 $\text{RMS}_i \leq \text{RMS}_0$ 的 H_i 即为 H_{subs} . 定义 D_j 为当针尖抬高到 H_j 时的DNA分子的表现高度值, RMS_j 为不包含DNA分子区域的图像粗糙度. 如果满足 $D_j \leq \text{RMS}_j$ 时, 我们认为此时DNA分子的反差基本消失. 以 H_j 为零起连续计算提高过程中的 D_j 值, 第 1 个满足 $D_j \leq \text{RMS}_j$ 条件的针尖抬高高度 H_j 即为 H_{DNA} .

2 结果和讨论

通常情况下, 我们用 TMAFM 测得的 DNA 分子的高度为 0.8 ± 0.2 nm. 图 2 是用 LMAFM 在通过逐步改变抬高扫描高度得到的一组有代表性的图像. 这是在镍离子修饰的云母表面测得的 DNA 分子图像. 图2(b)是抬高扫描高度为零时的 DNA 分子的振幅图像, (c) 针尖刚刚脱离衬底表面的情况, (d) 表示针尖刚刚接触 DNA 分子的顶部的情况. 作为对照, 我们给出了主扫描下相应区域的 TMAFM 下的高度形貌像, 如图 2(a)所示. 逐步改变抬高扫描高度, 可以由公式(2)计算得到针尖抬高过程中DNA分子恢复的可逆形变量. 在 TMAFM 下, 测得 DNA 分子的高度为 0.8 ± 0.2 nm. 在实验中, 利用 LMAFM 测到的 DNA

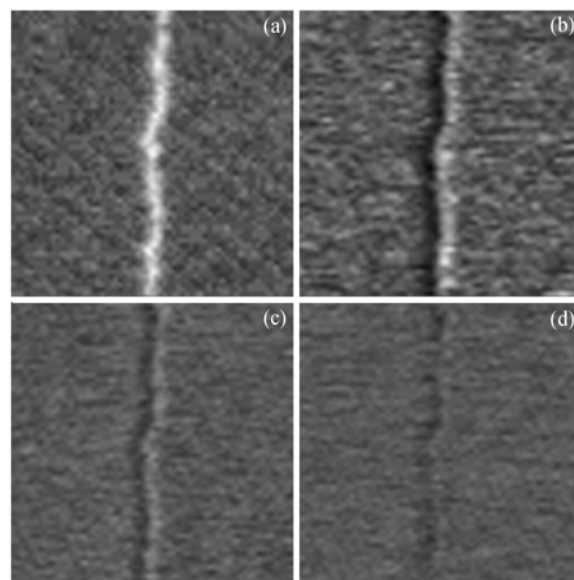


图2 DNA 的高度测量

分子的高度值为 1.5 ± 0.2 nm, 这与用 VSPFM 测得的 DNA 分子在空气中的高度相当^[10]. 图 3 是在镍离子修饰的云母表面 DNA 分子高度的统计结果, 由图可以看出, 利用 LMAFM 测得的 DNA 分子的高度远大于正常 TMAFM 下的 DNA 分子高度. 这是由于针尖的抬高减小了针尖对 DNA 分子的作用力, 从而减小了 DNA 分子的压缩变形, 表明针尖对 DNA 分子的作用力导致 DNA 分子发生形变, 并使得在传统 TMAFM 下测得的 DNA 分子高度很低.

通常情况下, 扫描管在扫描过程中会有热漂移, 热漂移会导致测量的结果不准确. 所以在实验过程中, 必须确保在基本上没有热漂移的情况下进行测量. 在最小力成像条件下, 常规 TMAFM 测得 DNA 分子高度为 0.8 ± 0.2 nm. 在抬高模式下, 实验结果的统计显示, 当抬高扫描高度抬到 $0.5 \sim 0.7$ nm 时, 衬底表面反差已经开始消失, 在针尖逐渐抬高到 $1.1 \sim 1.5$ nm 时, DNA 分子的反差也基本上消失, 由此利用公式(1)可以知道针尖抬高过程中 DNA 分子恢复的可逆形变量, 这样利用公式(2)可以知道 DNA 分子在 LMAFM 下 DNA 分子的实际高度. 为了排除针尖的影响, 我们使用不同弹性系数的针尖, 得到了基本一致的实验结果, 说明在 LMAFM 下针尖对测量 DNA 分子的高度影响不大.

胶体金为校准的标准样品已经常规地运用于 AFM 实验中^[13,14], 在实验中, 我们也选择胶体金颗粒作为标准参照样品, 得到了一组胶体金颗粒的反差逐渐消失的实验数据(图像未显示). 图 4 是对 10 个胶体金颗粒进行测量的统计结果. 结果表明, 利用 LMAFM

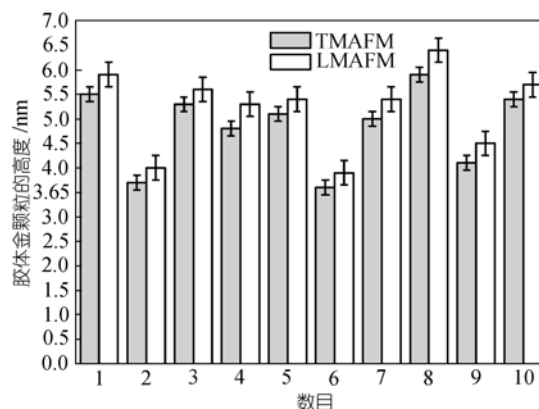


图 4 胶体金颗粒在 TMAFM 和 LMAFM 两种测量方法测得的结果比较

测量胶体金颗粒的高度与常规 TMAFM 下得到的结果几乎一致, 验证了本方法用于高度测量的准确性和可靠性.

利用 LMAFM 测得镍离子修饰的云母表面 DNA 分子的高度是 1.5 ± 0.2 nm, 还是低于人们普遍认可的 DNA 分子的直径 $2 \sim 2.2$ nm, 我们认为可能有以下几个方面的原因:

(1) DNA 分子的脱水, 我们的实验是在相对湿度 25%~30% 的条件下进行的. 由于 DNA 分子的脱水可能造成 DNA 分子的高度有所降低^[15]; DNA 分子的高度在水合状态下是比在脱水状态下高, 这也是为什么在溶液状态下的 DNA 分子高度远远大于在空气中的 DNA 分子高度. 但由于高湿度可能会引起样品表面水膜的存在影响实验, 所以必须保持低湿度条件.

(2) 所有的实验结果都是衬底和 DNA 分子之间的相对值, 由于衬底的吸附作用, 可能造成柔软的 DNA 分子部分塌陷, 而这部分在实验中是无法测量的, 从而导致 DNA 分子的测量值降低. 我们曾经在原位连续观察了 72 小时的结果显示, DNA 分子刚刚制备好以后就立即测量的高度要大于 72 h 后测量得到的高度, 这可能是 DNA 分子和衬底吸附变得更加牢固的原因.

(3) DNA 分子的部分塑性形变. 虽然我们在 TMAFM 实验中尽量保持在最小的力作用下测量 DNA 分子的高度, 但即使是这个最小力可能已经造成了 DNA 分子的部分塑性形变, 属于不可逆形变. 我们利用 LMAFM 下测量出的只是 DNA 分子的可逆形变量, 可以说在 LMAFM 测出的是 DNA 分子在针尖的作用下的可逆弹性形变量.

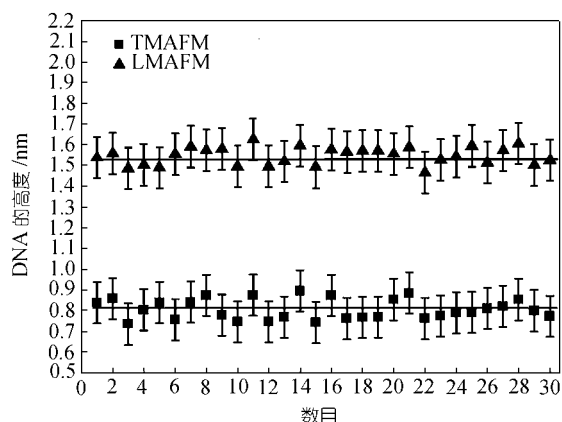


图 3 在镍离子修饰云母上的 30 根不同的 DNA 片断的高度测量结果比较

3 结论

本文利用原子力显微镜抬高模式测量 DNA 分子的高度. 通过不断抬高针尖高度, 减小针尖对 DNA 分子的作用力, 减小了 DNA 分子由于针尖压力导致的形变量, 通过记录针尖的抬高高度来计算 DNA 分子的高度. 本文测得具有良好刚性的胶体金颗粒的高度和传统的轻敲模式原子力显微镜测得的高度一致, 以验证方法的可靠性. 实验中利用原子力显微镜抬高模式测得的 DNA 分子高度已经远大于传统轻敲模式原子力显微镜下测得的 DNA 分子的高度. 验证了针尖的作用力是一个引起传统轻敲模式原子力显微镜下测得的 DNA 分子高度很低的重要因素. 本实验采取的方法也可以应用于测量其它软样品的高度.

原子力显微镜的抬高模式不仅可以在空气中对 DNA 分子等软样品的高度进行测量, 而且可以测量在溶液环境下的 DNA 分子等软样品的高度. 在溶液中, DNA 的结构和功能更接近其生理状态, 因此研究溶液中 DNA 分子的高度也更具有理论和实际意义. 同时, 这种方法主要是通过改变不同的作用力来测量样品的形变量. 如果进一步将作用力定量测量和表示, 那么根据作用力的变化量和样品的形变量, 就可以计算出样品的弹性模量. 软样品的弹性测量很可能开辟了抬高模式的一个非常重要的研究方向.

致谢 本工作为国家自然科学基金重点项目(批准号: 10335070, 30200051, 29579293 和 10304011)、中国科学院知识创新工程(批准号: KJ 951-A1-603, KJ 951-A1-409, KJ 952-J1-469, KJCX 1-06, KSCX I-06)、中国科学院特别支持项目(批准号: STZ-00-07)、上海市科委纳米专项(批准号: 0114NM070, 00XD14029, 0352NM118)、国家科技部项目(批准号: 2002CCA00600, 2003BA310A02)资助项目.

参 考 文 献

- Gössl L, Shu A D, Schlüter J P, et al. Molecular structure of Single DNA complexes with positively charged dendronized polymers I. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 6860~6865[DOI]
- Pietrasanta L I, Thrower D, Hsieh W, et al. Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 3757~3762[DOI]
- Thomson N H, Kasas S, Smith B, et al. Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging. *Langmuir*, 1996, 12: 5905~5908[DOI]
- Hansma H G, Revenko I, Kim K, et al. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 713~720[DOI]
- Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S, Aki T, et al. Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU. *Nucl Acids Res*, 1997, 25: 873~876[DOI]
- Maeda Y, Matsumoto T, Kaway T. Observation of single- and double-stranded DNA using noncontact AFM. *Appl Surf Sci*, 1999, 140: 400~405[DOI]
- Moreno-Herrero F, Herrero P, Colchero J, et al. Analysis by atomic force microscopy of Med8 binding to cis-acting regulatory elements of the SUC2 and HXK2 genes of *saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1999, 459: 427~432[DOI]
- Ye J Y, Umemura K, Ishikawa M, et al. Atomic force microscopy of DNA molecules stretched by spin-coating technique. *Anal Biochem*, 2000, 281 (1): 21~25[DOI]
- Watson J D, Crick F H C. Molecular structure in nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737~738
- Li X J, Sun J L, Zhou X F, et al. Height measurement of dsDNA and antibodies adsorbed on solid substrates in air by vibrating mode scanning polarization force microscopy. *J Vac Sci Technol B*, 2003, 21(3): 1071~1073
- Digital Instruments Veeco Metrology Group. Digital Instrument Multimode TM SPM Instruction Manual. Version 4.31ce, Copyright 1996~1999. 12-1~12-8
- Yokota H, Sunwoo J, Sarikaya M, et al., Spin-stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy. *Anal Chem*. 1999, 71(19): 4418~4422[DOI]
- Fritzsche W, Martin L, Dobbs D, et al. Reconstruction of ribosomal subunits and rDNA chromatin imaged by scanning force microscopy. *J Vac Sci Technol B*, 1996, 14: 1405~1409[DOI]
- Xu S, Arnsdorf M F. Scanning (atomic) force microscopy imaging of earthworm haemoglobin calibrated with spherical colloidal gold particles. *J Microscopy*, 1997, 187: 43~53[DOI]
- Bustamante C, Rivetti C, Keller D J. Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, 7: 709~716[DOI]

(2004-02-27 收稿, 2004-06-14 收修改稿)