



УДК 577.113.(012+088.52)

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАБЛЮДЕНИЯ ДНК В АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОП

© 1999 г. В. В. Прохоров[#], Д. В. Клинов, В. В. Демин*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 07.05.98 г. Принята к печати 27.10.98 г.

Показано, что эффективным способом преодоления невоспроизводимости результатов атомно-силовых измерений ДНК в условиях воздушного окружения, обусловленной наличием водного мениска в области микроконтакта зонда со сканируемой поверхностью, является обдув образца горячим газом в процессе сканирования. Исследованы также факторы, влияющие на двумерную конформацию молекул ДНК при адсорбции на поверхность слюды и контрастность их изображений: окрашивание уранилацетатом и длительность стадии промывки. Предложен метод расправления длинных молекул ДНК при адсорбции их в приповерхностном градиенте потока жидкости.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; контактный режим сканирования; относительная влажность; нанесение ДНК.

За десятилетие своего существования атомно-силовая микроскопия (АСМ) [1] зарекомендовала себя как метод, удачно дополняющий традиционные методы исследования биологических объектов. Вместе с тем, целый ряд методических проблем все еще затрудняет использование АСМ в качестве рутинного метода визуализации биополимеров. Так, при проведении АСМ-наблюдений ДНК было обнаружено отрицательное влияние относительно высокой влажности воздушной среды на возможность получения качественного изображения этих молекул [2, 3]. В опубликованных работах влажность в камере АСМ понижали за счет изменения весового соотношения сухого и влажного компонентов газовой смеси, температуру же смеси поддерживали неизменной (комнатной). Известно однако, что влажность газовой среды можно значительно уменьшить ее нагревом. Именно этот подход используется в данной работе для поиска оптимальных условий визуализации ДНК. Кроме того, исследовано влияние некоторых параметров наиболее часто используемой методики приготовления препаратов ДНК на слюде на качественные характеристики получаемых изображений.

АСМ-измерения проводили в контактном режиме на атомно-силовом микроскопе NanoScope II (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Использовались коммерчески доступные кантилеверы из нитрида кремния с радиусом кривизны около 50 нм и жесткостью 0.06, 0.12, 0.38, 0.58 Н/м. Для уменьшения относительной влажности в зоне сканиро-

вания образцов, помещенный на рабочем столе микроскопа, обдувался подогретой струей азота. В качестве источника газа использовался сосуд Дьюара с жидким азотом. Испаряющийся азот по трубкам подавался в зону сканирования, проходя через нагреватель. Интенсивность потока азота регулировали изменением электрической мощности на резисторе, погруженном в дьюар. Температура газовой струи в области образца составляла 60–110°C. Необходимо отметить, что струя азота оказывала достаточно сильное (но медленное в масштабах времен сканирования) механическое возмущение на кантилевер, так как на нефильтрованных АСМ-изображениях, как правило, присутствовали широкие горизонтальные полосы, соответствующие значительным (на уровне единиц или даже нескольких десятков нанометров) перепадам высот. Несмотря на это, от них в большинстве случаев легко можно было избавиться фильтрацией исходного изображения с помощью фильтра FLATTEN, входящего в состав математического обеспечения NanoScope II.

По сравнению с обдувом холодным азотом, значительное улучшение качества АСМ-изображений ДНК происходило сразу после включения системы подогрева: требовалось лишь около 5 мин для релаксации температурных дрейфов (см., например, рис. 1). Характерная пятнистость фона, свойственная изображениям, полученным при комнатной температуре, исчезала, а изображения нитей ДНК были выше и имели меньшую ширину. Использование "горячего" обдува приводило одновременно и к уменьшению в 1.5–3 раза силы адгезии микрозонда к поверхности.

[#] Автор для переписки.

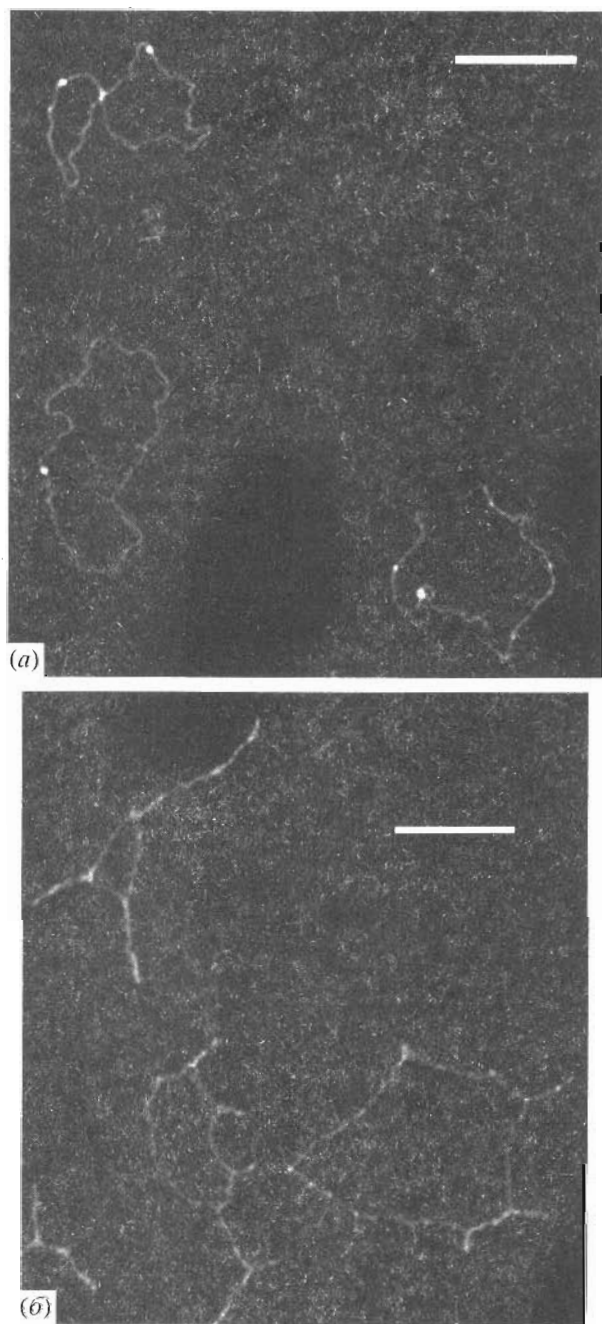


Рис. 1. АСМ-изображения двухцепочечной ДНК фага M13mp18, полученные в условиях обдува образца горячим азотом, при различных временах промывки без окрашивания уранилацетатом: *a* – 30 мин – молекулы хорошо расправлены, яркие точки соответствуют молекулам стрептавидина; *б* – 5 мин – видны характерные изломы на нитях ДНК. Горизонтальные отрезки – 0,5 мкм.

Поскольку величины парциального давления насыщенных водных паров известны из справочников (см., например, [4]), нетрудно подсчитать, что нагрев до 100°C уменьшает влажность газовой среды более чем в 30 раз. Таким образом, да-

же при наихудших стартовых условиях 100%-ной влажности при 20°C последующий нагрев газовой смеси до температуры около 100°C эквивалентен использованию сухих газовых смесей комнатной температуры с относительной влажностью на уровне единиц процентов, что, видимо, объясняет высокую воспроизводимость получаемых изображений.

Дополнительное улучшение качества изображений может быть достигнуто при окрашивании ДНК, адсорбированной на поверхности слюды, 0,1% водным раствором уранилацетата. Такие изображения более контрастны за счет увеличения высоты молекул в 2–3 раза. Увеличение высоты ДНК на АСМ-изображениях, полученных с использованием уранилацетата, отмечалось впервые в работе [5], где приводились значения $1.1 \pm \pm 0.2$ нм. Использование описанной выше методики обдува горячим азотом в сочетании с обработкой уранилацетатом увеличивает высоту ДНК до 0,8–2,0 нм.

Было обнаружено также, что такое окрашивание заметно ускоряет подготовку образцов для микроскопирования за счет сокращения времени их промывки после адсорбции ДНК на слюду до 5 мин (обычно следует промывать не менее 30 мин). Недостаточная промывка приводит к появлению на изображениях нитей ДНК характерных изломов и шпилек (ср. рис. 1*a* и 1*б*). Оказалось, что окрашивание уранилацетатом приводит к появлению расправленных конформаций адсорбированных молекул ДНК даже при полном исключении стадии промывки из методики приготовления препарата. На рис. 2*a* приведено изображение окрашенной уранилацетатом ДНК космиды длиной 35 т.п.о., на котором плавность контура прослеживается по всей длине молекулы.

Еще одной проблемой, возникающей при визуализации длинных фрагментов ДНК, является наличие пересечений нитей, крайне затрудняющих интерпретацию изображений, например при картировании. На рис. 2*б* приведены изображения длинных ДНК, нанесенных на поверхность слюды адсорбцией из постоянного потока жидкости (время адсорбции – 5 мин). Видно, что молекулы вытянуты вдоль направления потока, что делает их изображения удобными для последующего анализа (ср. с рис. 2*a*). Метод прост в реализации, так как не требует применения химической модификации поверхности подложки и/или ДНК (ср. [6, 7]), может быть рутинно использован для получения расправленных конформаций длинных ДНК. При этом количество расходуемой ДНК лишь в несколько раз больше, чем при использовании, например, капельной методики.

В заключение можно отметить, что на сегодняшний день подавляющая часть АСМ-изобра-

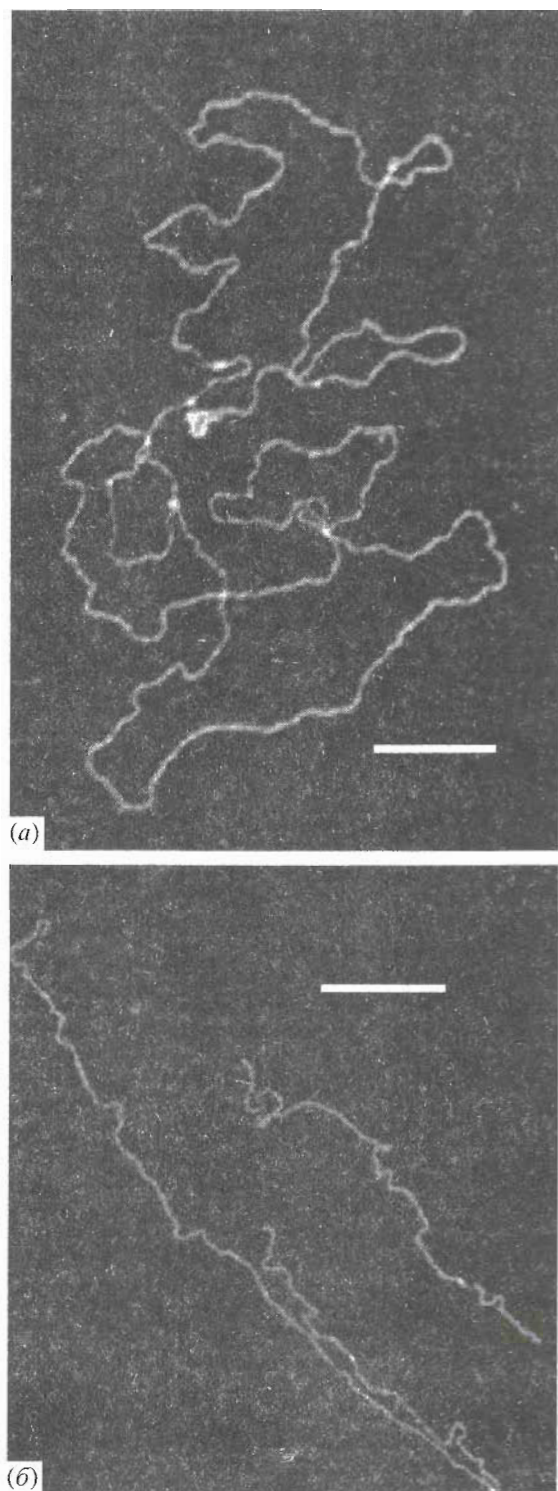


Рис. 2. АСМ-изображения длинных ДНК, полученные в условиях обдува образца горячим азотом, при нанесении на стекло разными методами: *а* – космидная ДНК (36000 п.о.), нанесенная капельным методом с постадсорбционным окрашиванием уранилацетатом, время адсорбции 15 мин, концентрация ДНК 0.5 мкг/мл; *б* – фрагменты ДНК фага λ , нанесенные на стекло адсорбцией из потока, время адсорбции 5 мин, концентрация ДНК 0.05 мкг/мл. Горизонтальные отрезки – 0.5 мкм.

жений ДНК получается на приборах третьего поколения АСМ, типа NanoScope III, с использованием методики частотной съемки (“tapping mode”). Несомненно, эта методика имеет ряд принципиальных преимуществ в сравнении с обычной “контактной” [8]. Однако большая статистика наших наблюдений показывает, что при обдуве образца горячим азотом и в контактном режиме сканирования можно воспроизводимо получать контрастные АСМ-изображения ДНК. Это становится особенно важным при проведении рутинных наблюдений, требующих набора большого объема данных (порядка сотен молекул) [9, 10]. В этом случае время, необходимое для получения такой статистики, зависит, в частности, от скорости сканирования поверхности образца. Для методики частотной съемки скорость составляет 1–3 Гц, тогда как при контактном режиме она может быть заметно больше. Так, приведенные на рис. 1 и 2 изображения были получены при частоте сканирования 7 Гц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Binnig G., Quate C.F., Gerber C. // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56. P. 930.
2. Thundat T., Warkmark R.J., Allison D.P., Bottomley L.A., Lourenco A.J., Ferrell T.L. // *J. Vac. Sci. Technol.* 1992. A10. P. 630–635.
3. Vesenka J., Manne S., Yang G., Bustamante C.J., Henderson E. // *Scanning microscopy.* 1993. V. 7. P. 781–788.
4. Справочник химика / Ред Никольский Б.П. М.: Госхимиздат, 1962. Т. 1.
5. Mastrangelo I.A., Bezanilla M., Hansma P.K., Hough P.V.C., Hansma H.G. // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 293–298.
6. Bensimon A., Simon A., Chiffaudel A., Croquette V., Heslot F., Bensimon D. // *Science.* 1994. V. 265. P. 2096–2098.
7. Yokota H., Johnson F., Hongbo L., Robinson R.M., Bellu A.M., Garrison M.D., Ratner B.D., Trask B.J., Miller D.L. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1064–1070.
8. Hansma P.K., Cleveland J.P., Radmacher M., Walters D.A., Hillner P.E., Bezanilla M., Fritz M., Vie D., Hansma H.G., Prater C.B., Massire J., Fukunaga L., Gurley J., Elings V. // *Appl. Phys. Lett.* 1994. V. 64. P. 1738–1740.
9. Prokhorov V.V., Klinov D.V., Lagutina I.V., Demin V.V., Cherny D.I. // *Proc. of 9th Int. Conf. on Scanning Tunneling Microscopy / Spectroscopy and Related Techniques.* Hamburg, 1997.
10. Lagutina I.V., Prokhorov V.V., Klinov D.V., Demin V.V., Cherny D.I., Sverdlov E.D. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4603–4610.

Methodological Peculiarities of DNA Observation by Atomic Force Microscopy

V. V. Prokhorov[#], D. V. Klinov, and V. V. Demin

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117871 Russia*

It is shown that the effective way to overcome the nonreproducibility of atomic force measurements of DNA in an air environment, which is due to a water meniscus in the contact region of the probe with the surface being scanned, is blowing a hot gas during the the scan of the sample. Factors affecting the two-dimensional conformation of the DNA molecules upon adsorption on mica and the contrast of their images, i.e., staining with uranyl acetate and duration of washing, were also studied. A procedure for the alignment of long DNA molecules during their adsorption in the near-surface gradient of the liquid flow is suggested.

Key words: atomic force microscopy, contact mode imaging, relative humidity, DNA deposition

[#] *To whom correspondence should be addressed.*

Сдано в набор 02.12.98 г.

Подписано к печати 05.02.99 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.8 тыс.

Уч.-изд. л. 10.7

Бум. л. 5.0

Тираж 264 экз.

Зак. 2343