

原子力显微镜扫描成像 DNA 分子

冉诗勇,王艳伟,杨光参

(温州大学物理与电子信息工程学院,浙江温州 325035)

摘 要:采用 Mg²⁺处理 DNA、APTES 或戊二醛修饰云母表面、DNA 拉直方法制备了 λ-DNA 及 DNA-组蛋白复合 物样品. 室温下原子力显微镜以轻敲模式在空气中扫描样品成像. 实验结果表明:AFM 扫描成像的效果与样品的制备 方法有关,同时也受操作因素影响.

关键词:AFM;DNA;成像

中图分类号:Q6-33 文献标识码:A

文章编号:1005-4642(2011)11-0001-04

1 引 言

1982年, IBM 瑞士苏黎士实验室的宾尼 (Gerd Binning)和罗雷尔(Heinrich Rohrer)研制 出世界上第一台扫描隧道显微镜(STM)^[1],STM 使人类能在原子或分子的尺度上观察甚至操纵原 子,他们也因此获得了1986年的诺贝尔物理学 奖.STM 要求扫描样品是导电材料,应用上受到 了限制.为了拓宽应用范围,1986年宾尼在STM 的基础上发明了原子力显微镜(AFM)^[2].AFM 对样品无特别要求,一经发明就在各领域研究特 别是在生物大分子(如 DNA、蛋白质)扫描成像研 究领域得到了广泛的应用.

传统的近代物理实验教学一般引入 STM 扫 描实验^[3-5],所用样品一般是成品,学生亲自动手 制备样品可行性较小.与之相比,AFM 样品制备 的简便性使样品制备这一流程引入实验教学环节 成为可能.已往的科学研究中已积累了不少的生 物大分子 AFM 成像技术^[6-11].我们在近年来的 近代物理实验教学中,将生物物理研究实验技术 如单分子实验技术^[12]、AFM 等融入近代物理实 验教学和本科生毕业设计,取得了一定的教学效 果.本文将先介绍 AFM 的基本原理,然后介绍 AFM 用于 DNA 分子扫描成像的实验,着重于样 品制备技术和实验步骤.该实验既能让学生掌握 AFM 的原理,又能让他们学习一些基本的 AFM 扫描用生物样品制备方法.

2 实验原理

2.1 装置原理

AFM 利用微悬臂上的探针尖端充当力传感器.图1(a)为常用探针的光学显微镜成像,(b)为侧面图.针尖与样品之间的作用力会使悬臂偏转.因此当激光照射在微悬臂的末端时,其反射光的位置也会因为悬臂偏转而改变,造成偏移量的产生.系统利用四象限探测器将偏移量记录下并转换成电信号.以供控制器作信号处理(图2). AFM 检测到悬臂的偏转后,可以工作在恒高或恒力模式下得到形貌图像数据.在恒高模式下, 扫描器的高度是固定的,根据悬臂的形变信号转换成形貌图像,该模式一般用于原子级别平整度



图 1 不同模式探针的光学显微镜成像 以及探针的侧面图

收稿日期:2011-08-29;修改日期:2011-10-12

资助项目:浙江省自然科学基金资助项目(No. Y4110357);温州大学研究生教改项目(No. YJG200909)

作者简介:冉诗勇(1981一),男,湖北松滋人,温州大学物理与电子信息工程学院讲师,博士,主要从事软物质物理研究 和物理实验教学.



图 2 原子力显微镜基本结构示意图

样品成像. 在恒力模式下,悬臂偏转信号输入到 反馈电路,反馈系统根据信号相应地改变由压电 陶瓷管制备的扫描器的 Z 轴驱动电压,使之上下 运动,以维持针尖和样品原子的相互作用力恒定. 在此过程中,Z 轴驱动电压信号被转换成形貌图 像数据,该模式一般优先使用.

2.2 操作模式

原子力显微镜与样品间的相互作用以范德华 力为主,其作用势能一般用 Lennard-Jones 势能 函数表示: $V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{6} \right]$,式中 r 是 两原子的核间距, σ 是势能为0时原子核间距, ϵ 是势阱深度,是势能曲线上最低点势能的绝对值. 当悬臂尖端的原子与样品靠近,开始时吸引力起 主导作用,随着距离的减小,二者之间的吸引力与 排斥力将趋于平衡,当两原子进一步靠近时,范德 华力以斥力为主(图3). 根据使用的力的性质,可 以使仪器具有不同的操作模式. 接触模式利用的 是针尖与样品之间的排斥性质范德华力,用于研 究柔软的生物样品时由于接触可能使之受到破坏 并污染探针产生假象,因此并不是用于生物样品 扫描的理想模式. 非接触模式利用的是针尖与样 品之间的吸引性质范德华力,由于针尖与样品的 间距较大,样品的扫描分辨率较低. 轻敲模式是 介于接触模式和非接触模式之间的一种扫描模 式. 该模式下针尖与样品之间周期性地间歇接 触,好比针尖不断地敲击样品. 与非接触模式的 工作原理类似,是使悬臂振动,其振幅比非接触模 式更大,因而能间歇地与样品接触. 与非接触模 式相比,其分辨率更高;与接触模式相比,其克服 了因针尖划过样品而受到的摩擦力、黏附力、静电

力等的影响,并有效地避免了样品损坏,对于研究 比较软的样品如生物大分子而言十分有利.



图 3 Lennard-Jones 势能函数示意图

3 仪器装置

所用原子力显微镜型号为 SPM-9600(岛津 公司),轻敲模式探针购买自 Nanoworld,悬臂弹 性系数 42 N/m,共振频率 320 kHz. 样品在室温 下以轻敲模式在空气中成像.所有图像采集的扫 描频率为 2~3 Hz,尺寸为 512 像素×512 像素. 所有图片都经过平滑去噪处理以提高对比度.

4 样品制备

云母本身是层状结构,表面具有原子级别的 平整度,用透明胶布可以方便地解理得到干净平 整的表面,因此,本实验将云母切割成合适大小, 用双面胶粘在直径约 1 cm,厚约 1 mm 的圆形铁 片上,利用其作为衬底制备样品.实验所用水均 为去离子水. λ -DNA (48,502 个碱基对) 购于 NEB 公司,3-氨丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropylrtiethoxysilane, APTES)、戊二醛和组蛋白均购 于 Sigma 公司. 在实验时,采用 TE(10 mmol/L Tris-HCl+1 mmol/L EDTA, pH8.0)缓冲液来 稀释 λ -DNA. 图 4 所示是基本的样品处理流程 图,在该流程基础上可以增加或稍作改变一些操 作步骤以适应样品制备需求. 由于云母表面带负 电,而 DNA 分子也带负电,单纯地将 DNA 样品 沉积到云母表面会由于静电斥力而不能稳定地沉 积在云母表面.因而,一般对云母表面进行了修 饰或在 DNA 溶液中加入带正电的离子. 沉积在 云母表面的 DNA 构象一般是溶液中的线团 状态在二维表面上的投影,仍然是二维蜷曲的. 为方便观察或者统计分析,可以在必要时将 DNA 拉直成像. 下面具体介绍这些样品制备方法.



图 4 样品制备基本流程示意图

1) Mg^{2+} 处理 DNA 方法. 首先将 TE 溶液加 入 $MgCl_2$ 使其最终浓度为 3. 5 mmol/L,然后用 该 TE+3. 5 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲溶液稀释原始 DNA 溶液至 1 ng/μ L. 然后解理云母片得到新的 1 层云母面,用移液器取约 10 μ L 稀释 DNA 溶液 滴在表面,沉积 3 min,然后用约 200 μ L 纯水冲 洗,氮气吹干放入干燥器 1 h 以上待扫描.

2) APTES 处理云母表面方法. 首先取 1% (V/V)的 APTES 水溶液约 30 μ L 滴在新解理的 云母表面,放置约 15 min,用超纯水冲洗约 5 min,氮气吹干,然后放置在 120 ℃烘箱中加热 30 min(该步骤的目的是钝化表面),冷却后放于 干燥器中待用. 然后如图 4 所示将 1 ng/ μ L 的 DNA 溶液 10 μ L 滴在云母表面,沉积 3 min,接着 用纯水冲洗并氮气吹干放入干燥器.

3)戊二醛修饰云母表面方法.首先将 50 μL
0.01% (V/V)戊二醛用移液器滴在 APTES 处
理过的云母上,静置 5 min,然后用纯水冲洗
5 min,氮气吹干.接下来在该修饰云母上沉积
DNA的步骤与图 4 所示基本流程相同.

4) DNA 拉直方法. 首先将约 10 μL 稀释 DNA 溶液或 DNA-组蛋白复合物溶液滴在 APTES处理过的云母片上(由于 APTES 的疏水 作用,小液滴呈现小珠状),样品沉积在云母表面 约 5 min,用镊子夹着云母片与桌面成 45°,氮气 从液滴上方与云母成较小角度吹液滴,使其慢慢 脱离云母表面. 然后用移液器滴约 20 μL 纯水在 云母上,用移液器枪嘴稍微接触液滴的边缘,按照 第一步中液滴移动的方向慢慢吸走样品,如此重 复 20 次左右,氮气吹干,干燥.

5 实验结果与分析

图 5(a)为利用 Mg²⁺处理方法扫描得到的 λ-DNA 形貌,可以看到 DNA 处于自然蜷曲线团状

态,分布均匀,图像清晰,效果较好. APTES 是一 种硅烷化试剂,修饰在云母表面后其末端氨基能 够固定 DNA 片段,因此与 Mg²⁺处理方法相比具 有不易受操作因素而影响沉积 DNA 构象的优 点. 图 5(b)是在 APTES 处理的云母基底上利用 拉直技术成像的 DNA-组蛋白复合物形貌,可以 看到 DNA 的拉直效果很好,并且 DNA 与组蛋白 结合之后成串珠状形貌,与染色质结构类似. 由 于组蛋白带正电,如果组蛋白浓度过高,其正电荷 会完全中和所结合的 DNA 所带负电荷,甚至复 合物本身带上正电,从而与 APTES 处理的带正 电云母基底相排斥,造成复合物不能稳定地沉积, 导致扫描成像不能观察到复合物.因此,利用戊 二醛处理云母表面方法沉积带正电的生物大分子 复合物.图 5(c)即为利用该方法得到的高组蛋白 浓度下的 DNA-组蛋白复合物(组蛋白浓度为 60 nmol/L, DNA 浓度为 1.5 ng/µL)形貌,可以 看到复合物仍然能结合在云母上良好成像. 该方 法的原理是利用戊二醛的蛋白质偶联作用结合上 组蛋白分子并将之固定在衬底上,即使经过冲洗 和氮气干燥步骤也能得到稳定的沉积物.

扫描成像的效果还受操作因素的影响.具体 来说,Mg²⁺处理方法中如果 Mg²⁺浓度过高或者 冲洗不充分,过多的 Mg²⁺ 会通过离子桥连作用 造成 DNA 分子之间的交联,扫描时得到不理想 的网状结构.图 5(d)是 Mg²⁺浓度为 5 mmol/L 时由于冲洗不充分,有过多的 Mg²⁺参与 DNA 分 子之间的交联而造成的网状结构.而如果冲洗步 骤中移液器吸取溶液速度过快造成负压过高,可 能会将已沉积上的大分子吸入或者改变其沉积形 貌,很难观察到沉积的大分子或者非正常的形貌. 此外,氮气干燥时如果氮气流速过高,可能造成同 样的后果.因此,为提高实验的可重复性,需要控 制吸取速度和氮气流速使之适中.一般在云母片



(a)Mg²⁺ 处理方法扫描得到的 λ-DNA 形貌



(b)在 APTES 处理的云母基底上利用拉直技术 成像的 DNA-组蛋白复合物形貌



(c)利用戊二醛处理云母表面方法扫描成像得到的高 组蛋白浓度下的 DNA-组蛋白复合物形貌



(d) Mg²⁺ 浓度为 5 mmol/L 时,由于冲洗不充分导致
 有过多 Mg²⁺存在而形成的 DNA 网状结构
 图 5 λ-DNA 及 DNA-组蛋白复合物图像

边缘以低于 $3 \mu L/s$ 的速度吸取溶液,干燥时氮气 流速控制在刚好能吹走表面液滴的速度.

6 结束语

本文介绍了利用 AFM 成像 DNA 大分子以及 DNA-组蛋白质复合物的实验方法.该方法不仅可 用于科学研究,还可引入近代物理实验教学.该实 验的开设可提高学生的动手操作能力,并对生物学 中重要的大分子如 DNA 分子进行直接观察,拓宽 学生们对生物学与物理学结合领域的认识.

参考文献:

- [1] Binnig G, Rohrer H, Gerber C, et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy [J]. Physical Review Letters, 1982,49(1):57-61.
- [2] Binnig G, Quate C, Gerber C. Atomic force microscope [J]. Physical Review Letters, 1986, 56(9): 930-933.
- [3] 蔡德斌,刘方新,谢宁,等. STM 教学实验样品的拓展[J]. 物理实验,2007,27(6):11-13.
- [4] 马进,俞熹. 石墨原子 STM 图像的形变分析[J]. 物理实验,2008,28(5):1-4.
- [5] 牛建龙,吴雪,李枫,等. STM 钨针尖的制备[J]. 物 理实验,2010,30(4):1-3.
- [6] 蔡明辉,赵葵,展永,等. AFM 的 DNA 样品制备技 术研究[J]. 电子显微学报,2006,25(1):76-79.
- [7] Li J, Bai C, Wang C, et al. A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy [J]. Nucleic Acids Research, 1998,26(20):4785-4786.
- [8] Wang H D, Bash R, Yodh J G. Glutaraldehyde modified mica: A new surface for atomic force microscopy of chromatin [J]. Biophysical Journal, 2002,83(6):3619-3625.
- [9] 吴世英,张益,雷晓玲,等. 用液流操纵单个 DNA 分 子形成 纳 米 悬 链 线 图 形 [J]. 物 理 学 报,2002, 51(8):1887-1891.
- [10] 祭美菊,侯鹏,沈家尧,等. DNA 共价结合在化学 修饰云母片上的 AFM 研究[J]. 高等学校化学学 报,2003,24(9):1621-1623.
- [11] 焦卓锋,马秋梅,王艳伟,等. 一种单分子操纵 DNA-组蛋白复合物的新方法[J]. 浙江大学学报(理学 版),2011,38(1);38-40.
- [12] 冉诗勇,王艳伟,杨光参. DNA 分子力学性质的测 量[J]. 物理实验,2011,31(7):1-4.

(下转第12页)

4

强度的方向均垂直于每个矩形线圈的平面. 根据 磁通量的定义,这种情况下的线圈接收的磁感线 条数将达到最大值,从而提高了每个矩形线圈中 单位时间内磁通量的变化量,使得法拉第电磁感 应的现象更加明显,更加易于通过实验装置观察、 检验和测量到电磁感应的电流值,从而使利用简 单、方便的方法验证直电流周围磁场变化的规律 成为可能. 因此,可以利用这套实验装置,重新进 行上述各项实验内容,也就是通过改变 K 和 R, 改变 *ab* 中电流的大小和方向,观察 G 的指针偏 转情况来进一步验证直电流 *ab* 周围磁场的变化, 同样可以得到相同的结论.

3 结束语

探究直流导线周围磁场变化的规律,是基础 物理学教学的重要环节,利用直观的可操作的简 便装置来反映抽象的看不见的磁场与电流的联 系,对于物理教学具有一定的现实意义.本文提 出的这套实验装置,不但简单方便,可操作性强, 而且还涉及到了较多的电磁现象,可以进行多个 电磁实验,更好地验证了直电流周围磁场的变化 情况.

Exploring the changes of the magnetic field around DC wire

OU Ying-lei

(Department of Automation, Guangdong College of Industry and Commerce, Guangzhou, Guangdong510510, China)

Abstract: Using twist ring, coil, galvanometer, variable resistor and other devices, an experimental device for exploring the changes of the magnetic field around DC wire was designed. When the magnetic field was changed by varying the exciting current, the induced current was detected by a galvanometer. The relation between the magnetic flux and the current was presented.

Key words: direct current; magnetic field; magnetic flux; induced current

[责任编辑:尹冬梅]

(上接第4页)

Imaging of DNA molecules with atomic force microscopy

RAN Shi-yong, WANG Yan-wei, YANG Guang-can (School of Physics and Electronic Information Engineering, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: DNA molecules and DNA-histone complexes were deposited on mica using four methods: adding Mg^{2+} to DNA solution, modifying mica surface by 3-aminopropylrtiethoxysilane or glutaraldehyde, and straightening DNA. The scanning images of the four samples were obtained at room temperature with atomic force microscopy working in taping mode. The experimental results indicated that the quality of the image was affected by the deposition method and the operation procedure.

Key words: atomic force microscopy; DNA; imaging

[责任编辑:任德香]