

# pBR322 DNA 拓扑结构的原子力显微镜研究\*

张平城 白春礼 成英俊 方 晔 王忠怀 王乃新

(中国科学院化学研究所 STM 室, 北京 100080)

黄熙泰

(南开大学生物系, 天津 300071)

**摘要** 由大肠杆菌 HB101 细胞分离得到的 pBR322 DNA (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 溶解在 Tris·HCl-EDTA (1 mmol/L, pH8.5) 的溶液中。取上述样品滴加在新鲜剥离的云母基底上, 吸附约 1 min 后, 用磷钨酸染色, 然后用滤纸吸去基底上多余的残液。在大气下, 用本实验室自行研制的原子力显微镜对其进行成像, 获得了 pBR322 DNA 的分子分辨的原子力显微图象。这些图象表明, pBR322 DNA 存在若干种不同的拓扑结构: (1) 带有不同直径的环状松弛形 DNA; (2) 超浓缩型 DNA; (3) 两个分子的连环拓扑结构, 其中之一为松弛形, 另一个处于凝聚状态(可能是超螺旋、或是分子内打结); (4) 多分子连环拓扑结构, DNA 凝集成多链复合物; (5) 可能存在由单体转变成多聚体的中间体。

**关键词** pBR322 DNA 原子力显微镜 拓扑结构 成像

在生物学发展的历史过程中, 显微镜始终是一种重要的研究工具。扫描隧道显微镜的研制成功是显微学上的一场革命, 它导致了一系列扫描探针显微镜[原子力显微镜(AFM)、磁力显微镜(MFM)、弹道电子发射显微镜(BEEM)、光子扫描隧道显微镜(PSTM)]的诞生<sup>[1]</sup>。这些仪器通过一个探针接近被测物体的表面, 从而取得其表面在空间分辨上的某些特性信息, 如隧道电流(tunneling current)、相互作用力、离子电导性(ion conductance)、磁场分布等。在这一系列用于生物学研究的仪器中, 最有前途的应首推原子力显微镜。

原子力显微镜已被用来测定云母、金红石等非导电性或导电性极差的材料, 并已达到原子级分辨率。AFM 已被探索用来测定 DNA、蛋白质、生物膜等生物样品。目前, 原子力显微镜用来测定核酸结构方面的工作才刚刚开始。现有关于 DNA 方面的工作主要集中在探讨制样条件及成像质量<sup>[2-6]</sup>。本实验室已经用扫描隧道显微镜研究过一些类型的 DNA 结构<sup>[7, 8]</sup>, 但由于扫描隧道显微镜要求样品必须有较好的导电性, 因此, 对于 DNA 样品往往不易得到稳定的 STM 图象。因此, 人们已更倾向于用原子显微镜来研究生物大分子的结构。本文用原子

1994-02-28 收稿, 1994-08-03 收修改稿

\* 中国科学院重大项目基金资助课题

力显微镜对 pBR322 DNA 进行了成像,并进一步研究其拓扑结构。

## 1 材料及方法

### 1.1 pBR322 DNA 的制备

质粒 pBR322 DNA 取自大肠杆菌 101 细胞,用凝胶电泳方法对抽提物进行分离纯化,详细制备方法见黄熙泰等人的报道<sup>[9]</sup>。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)等为国产分析纯试剂。

### 1.2 AFM 实验的制样方法

约 5  $\mu\text{L}$  浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 pBR322 DNA 溶液(溶解在 0.1 mmol/L TE 缓冲液中, pH 8.5)滴加到新鲜剥离的云母表面上。约 1 min 后,用一小滤纸条沿液滴的边缘将残液吸去。立即滴加 1 滴 0.5% 的磷钨酸缓冲液(使用前用氢氧化钠溶液将其调至 pH 7),约 1min 后,用滤纸条除去多余的残液,然后在大气下用 AFM 进行观察。

### 1.3 实验仪器

实验中采用的激光检测原子力显微镜由本实验室自行研制,其详细描述见吴浚翰等人的报道<sup>[9]</sup>。所有图象数据均在大气下进行观察得到,图象采用恒力模式测量。氮化硅微悬臂采用 Digital Instruments 公司产品,其力常数  $k$  为 0.12 N/m(200  $\mu\text{m}$  长度),带有锥形的针尖。图象尺寸用 220 nm 的聚丙烯小球进行定标。AFM 图象数据用 180  $\times$  180 点阵存贮。除非特别声明,所给图象均为未经滤波处理的原始数据。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 的长度测量

质粒 pBR322 DNA 的分子量为  $2.8 \times 10^6$  u,包含 4 363 个碱基对,其线性长度为 1.49  $\mu\text{m}$ 。质粒 pBR322 DNA 存在线型、松弛型及超螺旋型多种拓扑结构。最近,黄熙泰等人通过电泳等方法,成功地证明了 pBR322 DNA 还存在着一种称为“超浓缩型(supercondensed)”的新奇拓

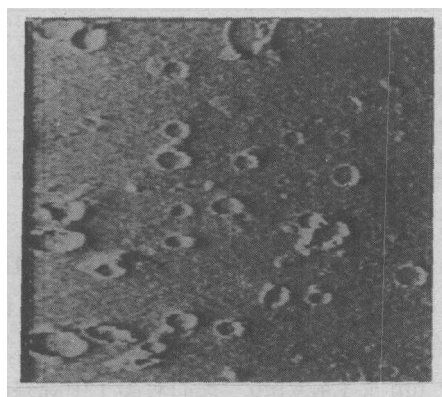


图 1 pBR322 DNA 的原子力显微图象  
图象在大气下直接测定,仪器工作方式为接触模式,所用的微悬臂的力常数为 0.12N/m,长度为 200  $\mu\text{m}$ ,图象通过恒力扫描得到。扫描范围为 11 890 nm  $\times$  13 020 nm

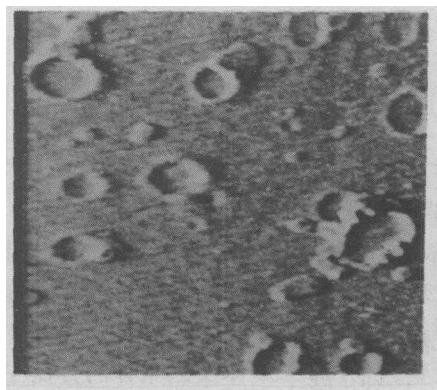


图 2 pBR322 DNA 的原子力显微图象  
实验条件同图 1,扫描范围为 5 950 nm  $\times$  6 510 nm

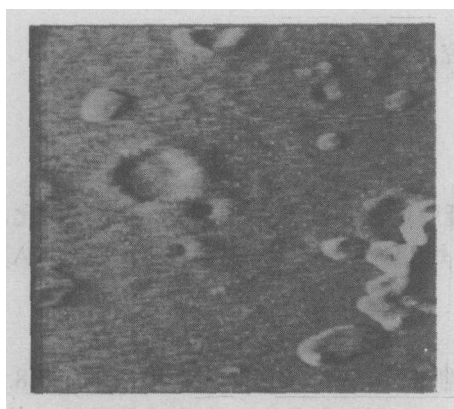


图 3 pBR322 DNA 的原子力显微图象  
实验条件同图 1, 扫描范围为 3 960 nm × 4 340 nm

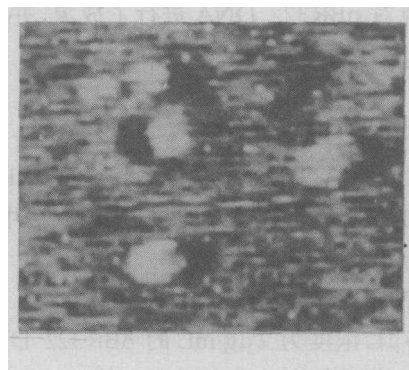
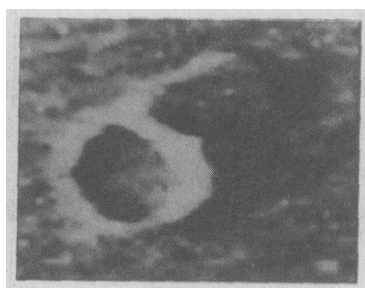
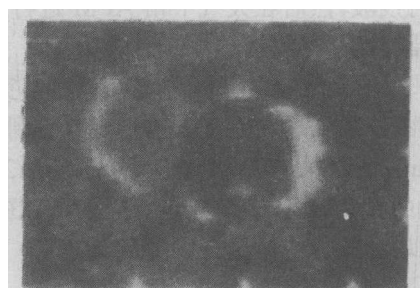


图 4 超浓缩 pBR322 DNA 结构的 AFM 图象



(a)



(b)

图 5 pBR322 DNA 的双分子连环拓扑结构

pBR322 DNA 中存在两个分子连环的拓扑结构, 其中一个分子为松弛形, 而另一个分子处于凝集状态 (a)  
或是超螺旋状态, 或是一个分子内打结 (b)

表 1 用原子力显微镜测量的松弛型 pBR322 DNA 的直径数值

分子	直径/nm	类型	分子	直径/nm	类型	分子	直径/nm	类型	分子	直径/nm	类型	分子	直径/nm	类型
a	1 056	二聚体	f	528	单体	k	924	二聚体	p	528	单体	u	858	二聚体
b	528	单体	g	594	单体	l	528	单体	q	826	二聚体	v	528	单体
c	528	单体	h	990	二聚体	m	963	二聚体	r	528	单体	w	438	单体
d	528	单体	i	594	单体	n	1 276	三聚体	s	813	二聚体	x	825	二聚体
e	426	单体	j	798	二聚体	o	594	单体	t	570	单体	y	1 420	三聚体

扑结构<sup>⑨</sup>。用上述方法得到的质粒 pBR322 DNA 吸附在新鲜剥离的云母基底上, 在大气下用 AFM 成象, 其结果如图 1 所示。其扫描范围约为  $12 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$ 。由图 1 所知, pBR322 DNA 分子呈现为环状的松弛型拓扑结构, 但环的直径有所不同。因为单体 pBR322 DNA 的长度为  $1.49 \mu\text{m}$ , 可以推出, 单体的环状松弛型 DNA 的直径应为 475 nm。二聚体及三聚体应为该数值的整数倍, 即二聚体及三聚体的直径应分别为 949 nm 及 1 424 nm。我们对图 1 中观察的松弛型 pBR322 DNA 分子的直径进行测量。将结果进行统计并列于表 1 中。由表 1 可知, 实验测得的单体、二聚体及三聚体的直径数值基本上与理论计算结果一致。在图 1 中, 有 56% 的 pBR322 DNA 为单体, 36% 为二聚体, 8% 为三聚体。可见, pBR322 DNA 分子大部分是以单体存在, 并有一部分发生二聚或三聚。

## 2.2 pBR322 DNA 的拓扑结构

尽管 DNA 的拓扑结构用常规透视电子显微镜已经观察到,但是,透射电子显微镜样品制作比较麻烦,需要用重金属进行投影或染色,样品观察要在真空下进行.原子力显微镜在样品制作上则较简单,只要将样品滴加到云母基底上,用滤纸吸去多余的溶液,略微干燥之后,就可对样品进行观察.图 1、图 2 及图 3 是我们用原子力显微镜对 pBR322 DNA 观察的结果.我们的实验曾采用磷钨酸对样品进行过染色,但必须指出,这一步骤在样品制作中并非必需,通过使用吸引模式或 Tapping 模式,或者在排斥力模式中尽可能地降低针尖与样品之间的相互作用,则染色步骤可以免去.

在 pBR322 DNA 的原子力显微图象中,我们可以观察到若干种特征的 DNA 拓扑结构:(1)特征的、分布均匀的环状松弛形 DNA(如图 1 所示).上面已经讨论,这些带有不同尺寸的分子是 pBR322 DNA 的寡聚体;(2)在图 1 中,我们还可辨认出一些球形的颗粒状物质.在图 2 及图 3 中,这种形态的结构可以更清晰地看到.图 4 是对图 3 中右上角区域中含有两个颗粒状物质进一步放大的结果.我们把这种形态的 DNA 指认为超浓缩 DNA.这种超浓缩结构与黄熙泰等用透视电子显微镜观察到的结果一致<sup>[9]</sup>;(3)对图 1 中的一些局部区域进行放大,所得图象如图 5 所示.这幅图象显示了 pBR322 DNA 的两种双分子连环拓扑结构.其中一个分子为松弛形,而另一个分子可能处于凝集状态(可能为超螺旋状态,或是一个分子内打结);(4)在图 1 的一些局部区域中,我们还发现, pBR322 DNA 可能存在多个分子的联环结构,并凝集成多链复合物,其结果如图 6(a)及(b)所示;(5)更为有趣的是,在图 1 的左下方区域,我们还找到一种由 3 个环状分子相连的结构.其放大后的图象如图 7 所示.从其放大后的图象可以看出,第一个环及第三个环是断开的,因此,它很可能是 pBR322 DNA 由单体向多聚体过渡的中间体.

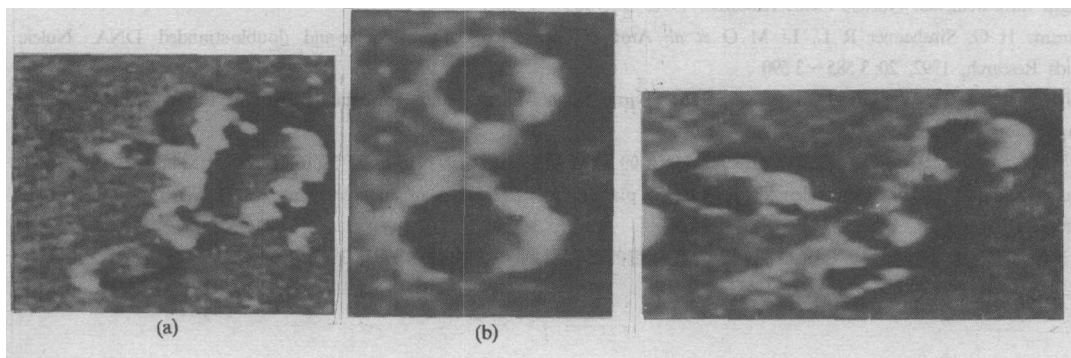


图 6 pBR322 DNA 的多分子联环结构  
pBR322 DNA 可能存在多个 DNA 的联环结构,并凝集成多链复合物;(a)多个 DNA 分子并联结合;(b)多个 DNA 分子串联结合

图 7 pBR322 DNA 单体向多聚体过渡的中间体

## 3 结论

原子力显微镜可以方便地用来研究 pBR322 DNA 的拓扑结构.上面的结果表明,用原子力显微镜所观察到的 pBR322 DNA 寡聚体的长度与理论计算结果基本一致. pBR322 DNA

的原子力显微图象表明,这种 DNA 存在松弛型、超浓缩型及多链复合物等多种拓扑结构形态,并可能存在由单体向寡聚体过渡的中间体。

由此可见,原子力显微镜是观察 DNA 拓扑结构的重要工具。通过对仪器进行改装,还可以使样品的测定在溶液中进行,这就可以使 DNA 的结构测定在更接近其自然存在的条件下完成。由于原子力显微镜并不要求对样品进行固定,也不一定要求进行投影或染色,因此,这种仪器有可能在生理缓冲液中对样品成象,并取得其动态数据,因此它在生物学研究中具有诱人的应用前景。除了成象之外,原子力显微镜还有可能在微米级或甚至纳米尺度上实现对生物材料的加工,并测定各种局域的物理和生物物理性质,可见用 AFM 来研究生物学问题有其潜在的重要意义。

**致谢** 作者对黄桂珍高级工程师及戴长春高级工程师在仪器维护方面的帮助,以及在实验过程中,李人力工程师在数据采集及图象处理方面的帮助,在此一并表示感谢。

### 参 考 文 献

- 1 白春礼. 扫描隧道显微术及其应用,在 STM 基础上发展起来的各种新型显微镜. 上海:上海科学出版社,1992. 91~132
- 2 Vesenka J, Guthold M, Tang C L *et al.* Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscopy*, 1992, 42-44: 1 243~1 249
- 3 Thundat T, Allison D P, Warmack R J *et al.* Imaging Isolated strands of DNA molecules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 1992, 42 ~44: 1 101~1 106
- 4 Hansma H G, Vesenka J, Siegenist C *et al.* Resroducible imaging and dissection of Plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science*, 1992, 256: 1 180~1 184
- 5 Lyubchenko Y L, Jacobs B L, Lindsay S M. Atomic force Microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 3 983~3 986
- 6 Hansma H G, Sinsheimer R L, Li M Q *et al.* Atomic force microscopy of single and double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 3 585~3 590
- 7 Bai C, Wang D W, Gu J G *et al.* STM Barrier-height images and topographic images of denatured DNA. *Nanobiology*, 1993, 2: 55~63
- 8 张平城,黄熙泰,王中怀等. 超螺旋 pBR322 DNA 的 STM 研究. *科学通报*, 1993, 38(16): 1 532~1 534
- 9 Huang X T, Chen X. Supercondensed structure of plasmid pBR322 DNA in an escherichia coli DNA topoisomerase II mutant. *J Mol Biol*, 1990, 216: 195~199
- 10 吴浚翰,成英俊,戴长春等. 激光检测原子力显微镜的研究研制. *科学通报*, 1993, 38(9): 790~792