

超螺旋 pBR322 DNA 的 STM 研究*

张平城 王中怀 白春礼

黄熙泰

(中国科学院化学研究所,北京 100080)

(南开大学生物系,天津 300071)

关键词 超螺旋、pBR322 DNA、扫描隧道显微镜、拓扑结构

扫描隧道显微镜 (STM) 是80年代初期新崛起的一种新型表面分析仪器,它具有达到原子级的空前分辨率,十几年来得到高度的重视并取得迅速的进展。近年来,人们已将其用来研究生物大分子的结构,尤其是将其用来揭示重要遗传物质——核酸的结构。1985年,Baro等开始了这方面的工作^[1],目前 STM 用来研究脱氧核糖核酸 (DNA) 的结构已经有一系列的报道。其中,Driscoll 等于1990年已获得原子尺度的 DNA 图像^[2],本实验室白春礼等已成功用 STM 观察到三链 DNA 的存在^[3]。但是,STM 用来研究生物大分子的结构仍存在一些问题。如何获得易重复的、可靠的结果是尚待进一步探讨的问题。本文用 STM 成功地对质粒 pBR322 DNA 进行了成像。

1 材料及方法

质粒 pBR322 DNA 分离纯化自大肠杆菌 101 细胞,实验过程中采用的浓度约为 0.2mg/ml,细胞色素 C 为 Sigma 公司产品。乙酸铵、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 及乙醇等为国产分析纯试剂。

用于 STM 实验的 DNA 制样方法如下:制作一直径约为 3—5mm 的金属圆环,将其在浓度约为 20 μ g/ml 的 DNA 溶液中沾一下后马上取出,使核酸溶液在金属环中形成薄膜。然后小心地将膜均匀地与基底表面接触,数分钟后移去金属环,在样品接近干燥但尚未干燥时移去金属环后,立即覆盖一薄层液体石蜡,然后用 STM 进行观察。

实验过程中使用本实验室自行研制的 STM-3000 型扫描隧道显微镜。图像分辨率为 180 \times 180 个像素。实验过程中采用恒流扫描模式。所得图像若无特别说明均为未经处理的原始数据。

2 结果及讨论

2.1 质粒 pBR322 DNA 结构的 STM 像

DNA 常见的拓扑结构形式有线型、松弛型、超螺旋型等多种形式,图 1 是这几种结构的图示。这些结构已被透射电镜所证实,但透射电镜方法必须对样品进行重金属投影,这使样品远离原来的存在状态。STM 方法可以不加重金属投影而直接观察样品。这能更真实地反映 DNA 分子的表面形貌。图 2、图 3 及图 4 是我们用 STM 直接观察超螺旋 pBR322 DNA 所获得的三幅图像。观察时采用恒流模式,偏压为 21mV,隧道电流为 0.31nA。制样所用的方

1993-02-05 收稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

法按照上述描述的步骤进行,将含 Tris-EDTA 缓冲液的 pBR322 DNA 样品加在石墨基底上,完成制样后立即在 STM 仪器上测量.比较图 1 所示的几种常见的 DNA 的拓扑结构可以知道,我们用 STM 所观察到的这几幅图像为超螺旋 DNA. 尽管类似于这种结构的例子在常规透射电镜中已多次证实过,但是透射电镜仅能观察到经重金属投影而被固定的结构. 而在我们的 STM 实验中,由于实验可以在一薄层的水溶液中进行,而不一定要用金属投影. 这就给我们提供了观察水溶液中 DNA 结构的可能性. 由上面三幅图像中的上方区域可以看到, DNA 的两股双链彼此分开,然后自上而下彼此靠近,相互缠绕而形成超螺旋结构,这类似于用透射电镜观察到的结果.

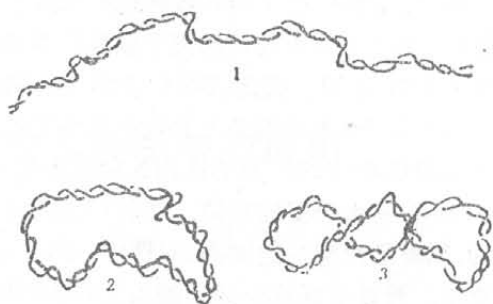


图 1 DNA 的几种拓扑结构图示
1 为线性 DNA, 2 为松弛型 DNA, 3 为超螺旋 DNA

2.2 pBR322 DNA 在扫描过程中的 STM 像的变化

图 2 是在实验开始扫描时所观察到的一个 pBR322 DNA 二聚体分子的 STM 图像,扫描范围为 $345 \times 1380 \text{nm}$, DNA 的表观宽度为 19.5nm . 这种强烈的加宽效应可能为诸多因素作用的结果. 针尖的锐度不够、针尖对样品施加的作用力、生物样品的柔性、溶液中盐离子在 DNA 上的沉积可能是 DNA 表观宽度加宽的若干因素. 图 3 是在原位上经数分钟后获得的图像,图 4 是在图 3 数分钟后又进一步获得的图像. 图 2 中观察到的 DNA 表观宽度约为 19.5nm ,图 3 中观察到的 DNA 的表观宽度减少到 11.7nm ,图 4 中双链 DNA 的宽度又进而变为约 3.9nm ,接近天然双链 DNA 的结晶时的螺旋直径. 图中 DNA 宽度从 19.5nm 减少



图 2 pBR322 DNA 在 Tris-EDTA (pH8.5) 缓冲液中的 STM 像

DNA 样品按照文中的方法制备,实验采用恒流模式,偏压为 21mV ,隧道电流为 0.31nA ,扫描范围为 $345 \times 1380 \text{nm}$

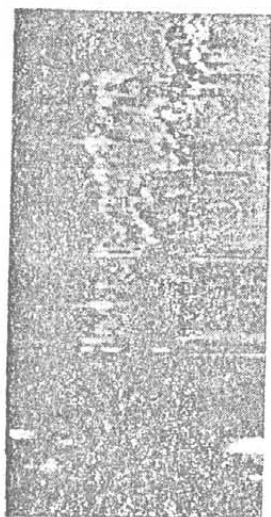


图 3 pBR322 DNA 在扫描过程中的 STM 像

实验条件同图 2. 但图像是在图 2 图像获得约 1min 后得到的图像. 扫描范围为 $462 \times 1404 \text{nm}$

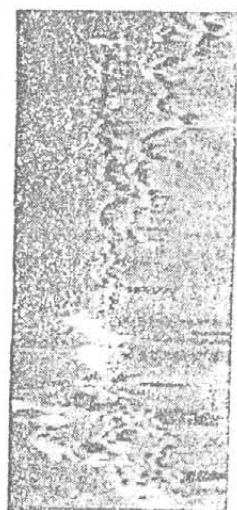


图 4 实验条件下具有最小表观宽度的 pBR322 DNA 的 STM 像

操作条件同图 3. 但该图像是在图 3 图像获得约 1min 后得到的图像. 扫描范围为 $368 \times 1348 \text{nm}$

到 3.9nm 的由粗变细的过程可能是 DNA 与周围环境的盐相互作用而导致其构象发生变化的一个直接的例证。这种结构变化可能出于下面的两个原因:

第一, DNA 分子与其微环境的水分子、盐离子发生作用而引起 DNA 形态上的变化。开始时, DNA 处于较低的离子强度的溶液中 [0.01mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.001mol/L EDTA (Na 盐)]。因此, DNA 主链上的磷酸基团有较大幅度的解离, 因而带有更多的负电荷, 双螺旋 DNA 的两条互补链之间由于都带负电荷而有更大的斥力。这种力使得较低离子强度下双螺旋 DNA 具有比用 X 射线衍射法测得的处于结晶状态的 B 型 DNA 的螺旋直径 (2.37nm) 有大得多的数值。随着扫描的进行, 由于水分的挥发, DNA 所处的溶液离子强度增加, 阳离子浓度随之增高, 双螺旋 DNA 的解离度降低, 因而互补双链之间的斥力降低, 距离变小。而处于螺旋中间的碱基之间的范德华力增大, 使 DNA 的双螺旋直径逐渐变小, 最后趋近于结晶 DNA 的螺旋直径数值。上面结果可能是双螺旋 DNA 动态结构观点的一个直接的证据。DNA 随着环境的变化它的构象具有很大的可塑性, 而这种构象可挠性对执行它的各种生物学功能是极为重要的。

第二, 超螺旋 pBR322 DNA 的 STM 像从图 2 到图 4 的宽度变化可能是由下面过程所致。超螺旋 DNA 表面吸附较多的溶液中的小分子(如水分子或缓冲液中的盐离子), 因此仪器所观察的 DNA 的螺旋直径呈现较大的表观尺寸。但是, 随着扫描的进行, 由于针尖与样品作用的结果, 表面部分小分子或离子被移去, 而 DNA 分子逐步裸露出来, 因此所观察到的图像中 DNA 链的表观宽度逐步变小。

实际上, Vesenska 等^[4]及 Bustamante 等^[5]用原子力显微镜在一些实验中也观察到 DNA 的表观宽度比 X-射线衍射方法所得的宽度较宽的现象。他们所观察到的 DNA 的表观宽度大约在 10—15nm 的范围, 我们所观察到的结果与此基本一致。

上面工作探讨了用于 STM 成像的生物大分子 (DNA) 的制样方法, 成功地观察到 pBR 322 DNA 的超螺旋结构, 并提供了在溶液中观察 DNA 结构的可能性。本实验结果表明, 用 STM 是观察溶液中 DNA 结构是一种有前途的方法。

参 考 文 献

- [1] Baro, A. M., Miranda, R., Alaman, J. et al., *Nature*, 1985, 315:253—254.
- [2] Driscoll, R. J., Youngquist, M. C., Baldeschwieler, J. D., *Nature*, 1990, 346:294—296.
- [3] 白春礼、叶坚、龚立三等, 科学通报, 1990, 35(24):1841—1842.
- [4] Vesenska, J., Gurhold, M., Tang, C. L. et al., *Ultramicroscopy*, 1992, 42—44:1243—1249.
- [5] Bustamante, C., Vesenska, J., Tang, C. L. et al., *Biochemistry*, 1992, 31:22—26.