

扫描探针显微镜及其在核酸结构研究中的应用

张平城 方 晔 白春礼

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

摘要 本文对扫描探针显微镜的特点作了简单的介绍,并与其他与之相关的技术(如扫描透射电镜等)作了比较,指出了扫描探针显微镜在生物学中应用所具有的优点与特色,以及扫描探针显微镜在生物材料研究中存在的问题。对解决这些问题所采用的方法,如基底选择、样品固定、溶液中成像、Hopping 技术及针尖修饰等一系列方法进行了描述,对扫描探针显微镜,尤其是原子力显微镜在核酸结构研究中的成功应用作了介绍。

关键词: 扫描探针显微镜, 原子力显微镜, 核酸, 结构, 成像

直接在分子或原子水平上对生物材料结构或生命现象进行观察,是人们长期以来为之努力奋斗的目标。为了达到这一目的,人们发展了各种显微镜,最初人们采用的是光学显微镜,但它受到其波长的限制而无法达到很高的分辨率,电子显微镜的发明,使人们对材料表面结构的观察在微观水平上达到更高的层次,80年代初期,又崛起了一种全新的显微镜,它被称为扫描隧道显微镜(STM)(Binnig等,1982),这种仪器能够在横向和纵向达到原子分辨率,它是显微学领域的一场革命。它的发明导致了一系列的扫描探针显微镜(SPM)的诞生(白春礼,1992),它们包括:原子力显微镜(AFM)、激光力显微镜(LFM)、静电力显微镜、扫描热显微镜、弹道电子发射显微镜(BEEM)、扫描隧道电位仪(STP)、扫描离子电导显微镜(SICM)、扫描近场光学显微镜(SNOM)和光子扫描隧道显微镜(PSTM)。其中,最为重要和最有前途的是原子力显微镜,它已在生物学的研究中被广泛地应用。下面就扫描隧道显微镜及原子力显微镜在生物学中的应用作一简单的介绍。

扫描探针显微镜的基本原理及特点

扫描探针显微镜通过一尖锐的探针在物体的表面扫描,从而获得被测物体表面在空间分辨上的某些特性信息。扫描隧道显微镜及原子力显微镜都是根据这种原理研制而成的,这些仪器的详细工作原理已有专门介绍(白春礼,1992)。STM及AFM在生命科学中的应用已经得到人们的广泛重视。它在细胞、病毒、核酸、蛋白质、酶及生物膜的

结构研究中已取得了初步的成果, 具有诱人的前景。

STM 和 AFM 与其它技术相比具有下面的一些优点。第 1, 它们能够在较高的分辨水平上观察样品的实三维表面结构。在 STM 出现以前, 没有一种显微技术能在横向和纵向都达到原子级分辨率; 第 2, 这类显微镜可以在不同的环境下工作, 不一定要要求高真空实验条件。样品测定可以在高真空下, 也可以在大气下进行。在低温、常温下, 甚至在有机溶剂中或水溶液中都能够获得分辨率很高的图像。因此, 它提供了在更接近天然条件下测定样品的可能性; 第 3, 这类显微镜不必象 X 射线衍射技术那样, 要求样品必须是晶体。也不象透射电镜那样, 需要超薄切片。第 4, STM 及 AFM 不必象电子显微镜那样一定需要用重金属投影, 这样, 它所观察到的图象更能直接反映样品的形貌。第 5, 借助快速的计算机图象采集系统, STM 和 AFM 还可用来跟踪一些快速过程, 可以直接用来观察细胞、亚细胞水平, 甚至分子水平上的快速动态变化 (Henderson 等, 1992)。第 6, STM 及 AFM 不仅作为直接观察形貌的工具, 而且可以在极小的尺度上实现对观察样品的加工 (Hansma 等, 1991), 这种能力是其它显微镜所难以达到的。

尽管 STM 和 AFM 具有上述的众多的优点, 但它们作为刚刚发展起来的新型仪器, 在生物学中的应用还存在一些问题。1) 基底的选择。对于 STM, 必须选择导电的基底, 如高定向石墨 (HOPG)、二硫化钼、金等导电材料作为基底。但这些材料的表面是疏水性的, 通常不利于生物材料的吸附, 而且这些材料的表面自身有时还存在缺陷。对 AFM, 则导电与不导电基底均可作为其基底, 云母可作为 AFM 的基底, 这种基底不仅在较大的范围内是平坦的, 而且其表面是亲水性的, 有利于生物材料的吸附; 2) 样品的导电性。由于生物材料导电性较差, 用 STM 观察时需要用导电膜覆盖, 或者样品要做得足够薄。对 AFM 则没有此限制。从上述两方面可见, AFM 用在生物材料结构的测定上比 STM 更为优越; 3) 样品的固定。由于仪器扫描时, 探针与样品之间存在相互作用, 如果不能将样品牢固地吸附在基底上, 则容易使样品在针尖扫描时发生移动。另外, 这种相互作用还会造成对样品的损伤; 4) 生物样品的柔软性。这种柔软性对于 STM 及 AFM 的观察都是不利的, 它增加了热振动并降低了仪器分辨率。

制样方法的改进

为了克服上面存在的若干问题, 以方便、容易、可靠、高分辨地获得生物材料及生物大分子的图象, 人们寻找了多种解决上述问题的方法, 并取得了一定的进展。

1. 基底的选择 对于 STM, 人们曾经用 HOPG (DeRose 等, 1991) 金 (DeRose, 1992) 等作为基底来直接吸附 DNA。也有的采用分子束外延的方法, 在云母表面上镀金, 这种方法可以获得较大范围的平坦导电表面, 以此作为吸附生物大分子的基底。对于 AFM, 则大多采用云母作为基底, 因为它的表面较为平坦, 并且是亲水性的, 有利于生物大分子的吸附。

2. 样品在基底表面的分散 制样的最为简单的方法是: 将样品的稀溶液加到基底表面, 让它自然干燥后吸附在基底表面上。它种方法虽然具有操作简单的优点, 但溶剂

挥发干燥后, 盐及样品沉积在一起, 这不仅使样品分布不均匀, 而且由于浓缩而形成的较厚的盐的沉积层有时还会掩盖样品的观察。为使生物样品能够在基底表面均匀地分散吸附, 往往在溶液中加入少量的表面活性剂(如十二烷基硫酸钠)或其它能减少表面张力的溶剂(如酒精等)。为获得均匀分布的样品, 人们还把透射电镜中使用的制样方法运用到 STM 及 AFM 中。在一些生物膜的研究中, 人们还采用了 L-B 膜制样方法, 以便用来获得单分子层生物膜。

3. 样品的固定 由于扫描探针显微镜(包括 STM 及 AFM)是通过一个与样品的表面非常接近的探针在样品的表面扫描而获得图象的, 通常该探针与样品之间存在相互作用, 这种作用有时会使吸附分子在扫描时发生移动而不易观察。这是一个引起人们关注的问题, 因此, 人们寻找了各种固定样品的方法, 其中包括化学方法及物理方法。

(1) 化学方法 a. 样品分子的化学改性 通过对样品进行化学修饰, 使与基底结合得更加牢固。例如, 三亚丙啶氧磷(Tri(1-aziridyl) phosphine oxide (TAPO))可通过亚丙啶与 DNA 的糖环发生反应而修饰到 DNA 上, 结果由于该试剂还存在能与金相联的磷氧基团, 因此修饰后的 DNA 更容易吸附在金基底上。

b. 基底表面的化学改性 增强样品在基底上吸附牢固性的另一办法是对基底表面进行化学改性。Heckl 等(1989)及 Lindsay 等(Lyubchenko 等, 1991)通过对 HOPG 表面氧化等一系列化学反应步骤, 对 HOPG 表面进行处理, 使其能够更好地将生物膜及 DNA 固定在 HOPG 表面上。用这种方法, Heckl 等曾经用 STM 观察到单个的脂分子。

Wilson 等(1991)提出了对硅表面进行化学修饰的方法。他们制备了带有氨基、巯基和烷烃头基的硅表面, 并测定了其接触角。他们的目标就是要表面的氨基质子化, 使之能够与核酸上带有负电荷的磷酸主链结合。Hausling 等(1991)将 11-巯基十一醇化学吸附在金(III)面上, 并测定了其接触角。结果表明这种醇能以单分子层吸附在金(III)面上。这种化合物分子的一端含有能与金表面结合的巯基, 另一端又含有能与吸附剂分子结合的羟基。它充当联接基底与吸附剂分子的桥梁, 使被吸附的分子能较好地固定在基底表面上。

(2) 物理方法 a. 样品表面镀膜 生物样品分散在基底表面之后, 可以通过蒸镀膜法使样品表面形成一层导电膜, 如金属膜或碳膜等。这种方法不仅能使样品在基底上得以良好的固定, 而且能够使样品表面刚性增加, 这有利于 STM 及 AFM 成像。尤其是 STM, 金属膜或碳膜的覆盖对改善样品的导电性将带来好处。

b. 基底表面作放电处理 将基底放在真空镀膜机中, 在一定的真空下作放电处理, 可以使 HOPG 及云母等的表面亲水性明显增加。这种方法曾经用于透射电镜中碳膜的处理, 将其用在 STM 及 AFM 的基底(如 HOPG 及云母等)的处理上也取得较好的效果。

4. 在水溶液或有机溶剂中成像 Lindsay 等人在水溶液条件下, 获得了 DNA 的 STM 图象(Lindsay 等, 1989)。他们采用了一个体积约为 50 μl 的小室来克服溶液蒸发所带来的问题。针尖外部裹以玻璃, 仅露出最尖端部分, 以至于使法拉第电流降至约 0.1nA。基底为金球, 另有一参比电极, 它与金球的电势差能够使 DNA 吸附到金球表

面。

5. Hopping 技术 Jericho 等(1990)发展了一种新的 STM 技术。这便是 Hopping 技术。所谓 Hopping 技术,是指当针尖沿 X 方向进行扫描时,周期性地使针尖在 Z 方向上撤离样品表面然后再接近,并保持每次撤离的距离相等。如果针尖撤离足够远,那么针尖对样品横向作用力就不会被累积,从而可减少针尖对样品的破坏作用。

6. 针尖修饰 Keller 等(1992)通过在扫描电子显微镜中的电子束沉积方法,制备了具有 10 nm 曲率半径,圆锥角大约为 15° 的微悬臂针尖,这种尖锐的针尖有利于改善成像的分辨率 (Zenhausern 等, 1992)。Hansma 等(1992)用这种体修饰后的针尖对 DNA 进行成像,证明具有较好的效果。

STM 及 AFM 在核酸研究中的应用

1985 年至 1992 年,人们对于 DNA 的研究主要处于探索阶段。在此期间的研究工

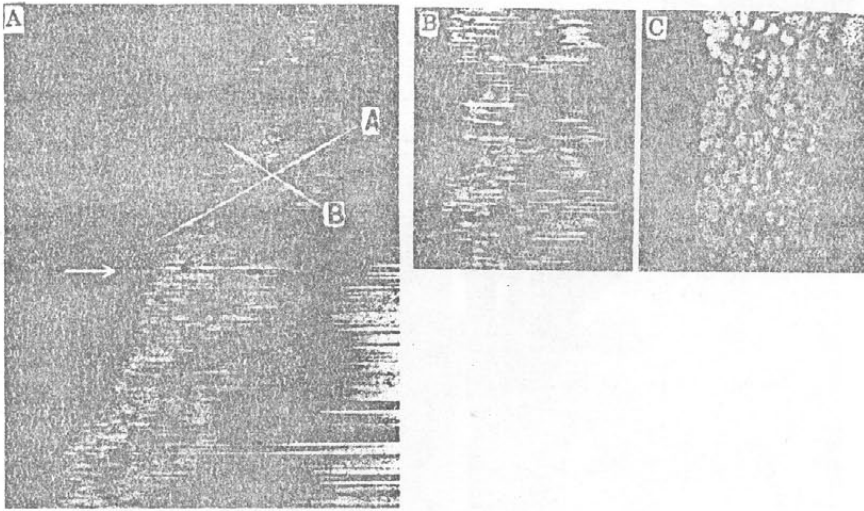


图 1 DNA 的原子分辨 STM 象

Fig. 1 STM image of DNA atomic resolution

A: 扫描范围约为 $8 \text{ nm} \times 12 \text{ nm}$, 隧道电流为 1 nA, 偏压为 100 mV;

B: 是在 A 图中底部区域的 DNA 图象; C: A 型 DNA 的范德华模型

作中,前阶段对 DNA 采用的主要研究手段为 STM,这阶段的研究主要是探索性的,所取得的成果也是初步的。当然,也有一些个别结果有所突破。例如,Driscoll 等曾经一度在真空中对 DNA 成像,获得了接近原子级的分辨率(图 1)。但系统的、易操作、易重复的成像 DNA 的可靠方法仍然没有建立。后来随着激光检测原子力显微镜

(LAFM) 的研制成功, 用原子力显微镜来测定样品变得容易。另外, 用 STM 来研究生物材料还存在着导电性的问题。因此, 在这一时期的后阶段, 对于 DNA 结构的研究, 已从 STM 转向 AFM。人们致力研究的事情仍然是寻找可靠的成像方法。成功地成像 DNA 的转机是在 1991 年第六届 STM 国际会议上, Vesenka 等关于用扫描力显微镜可靠地成像 DNA 的报道(这项成果已在 1992 年的 *Vltramicroscopy* 杂志上发表)。此后, 可靠地成像 DNA 的报道渐趋增多。下面就 STM 及 AFM 在 DNA 研究中的最新成果作一介绍。

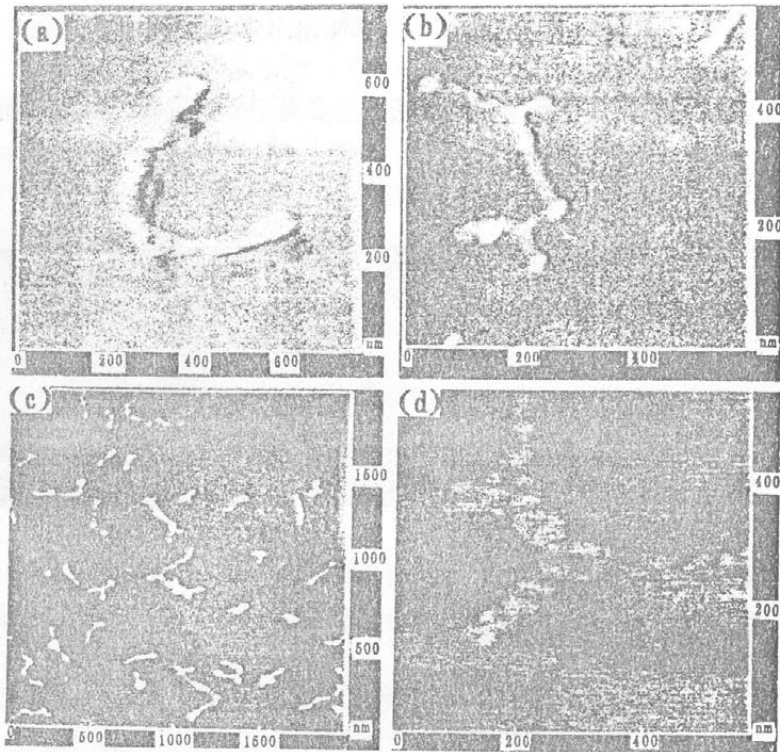


图 2 pBSP⁺质粒 DNA 的 AFM 图象

Fig. 2 AFM image of pBSP⁺ plasmid DNA

a: 在 35% 湿度时独立存在的单个 DNA 图象; b: 在 35% 湿度时独立存在的单个 DNA 的典型图象, 环状 DNA 卷曲成带支链的结构; c: 在 25% 湿度时的 DNA 图象, 扫描范围为 $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$; d: 在 $570\ \text{nm} \times 570\ \text{nm}$ 范围内扫描得到的超螺旋 DNA

1. 质粒 DNA 的成像 质粒 DNA 由于具有特征性的环状结构, 它们最先被人们用作检验 AFM 成像可靠性的典型样品。Thundat 等(1992)用 AFM 成像了来自 Strategen 的含有 3200 个碱基 pBS⁺质粒 DNA。他们采用的核酸浓度为 $0.35\text{--}10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 缓冲

液为 0.01 mol/L 的醋酸铵 (pH 7.2)。基底为新鲜剥离的云母, 未作其它处理。用这种方法制得的质粒 DNA 样品用 AFM 成像, 其结果如图 2 所示, 这种方法虽然可以成像 DNA, 但所得的图象不够理想, DNA 链明显地收缩在一起, 不利于其结构的观察。

在探索成像 DNA 的过程中, 首先成功获得较好图象的是 Vesenka 等的报道 (Zenhausern 等, 1992)。他们主要在三方面做了改进: 1) 对云母基底作离子交换处理及亲水处理。先将新鲜剥离的云母在去离子水/蒸馏水 (DDW) 中作超声处理, 然后将其悬浮在 33 mmol/L 的醋酸镁中过夜, 再在 DDW 中超声处理 30 min。由于镁离子取代了云母表面的钾离子, 使其能够提供能与 DNA 磷酸基团强烈结合的位点。而超声处理提供了观察生物大分子的平滑表面。在此基础上, 再将云母表面在 100–200 毫毛之间放电处理 15 s, 使表面硬化并增加亲水性。拿到空气中后, 立即将几微升

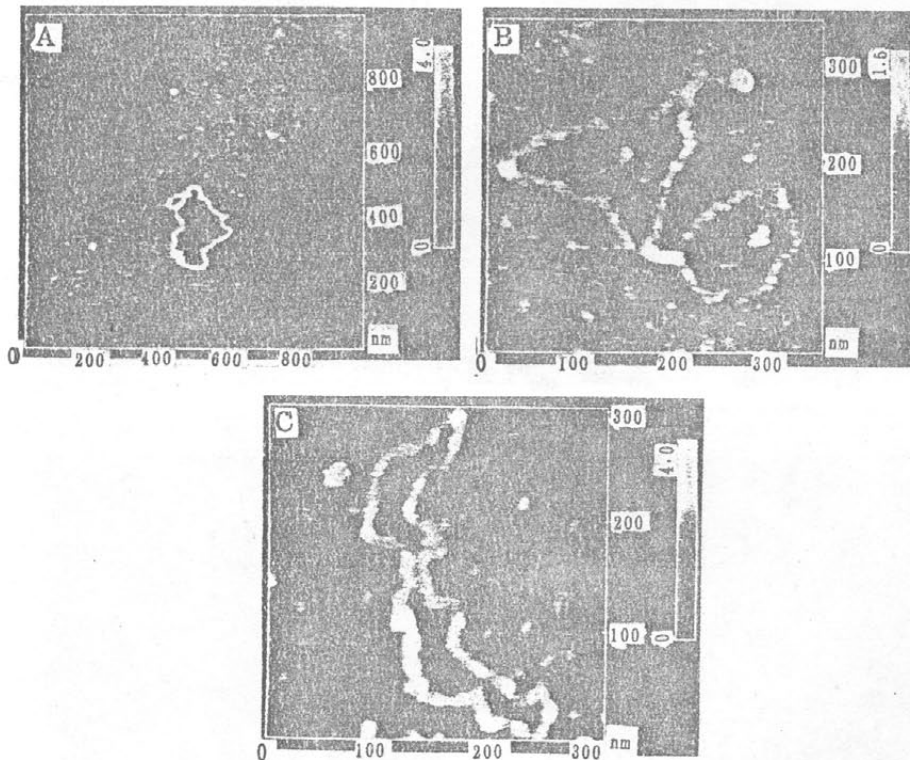


图 3 质粒 DNA 的 AFM 图象

Fig. 3 AFM image of plasmid DNA

A: 在 25% 湿度, 扫描力为 3 N 时的质粒 DNA 吸附在云母表面上的低放大倍数的图象; B: 3.1 kb 质粒 DNA 在 45% 湿度, 扫描力为 5 nN 时的图象, 所用微悬臂的长度为 100 μm ; C: 3.0 kb 质粒 DNA 在 50% 湿度, 扫描力为 3 nN 时的图象, 所用微悬臂的长度为 200 μm 。

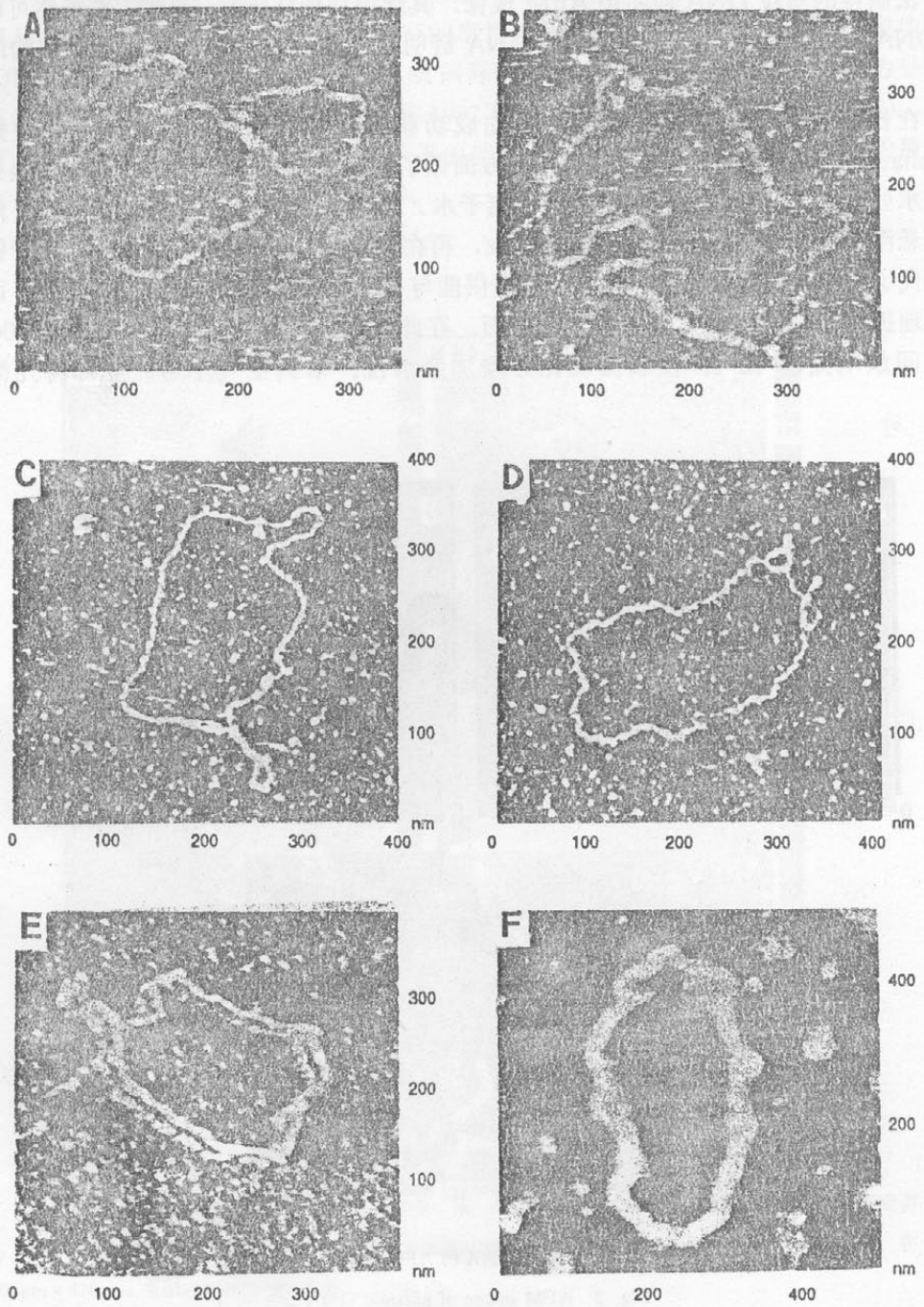


图 4 丙醇中质粒 DNA 的 AFM 图象

Fig. 4 AFM image of plasmid DNA in propanol

A、B及F为质粒 pSK 31 DNA 的图象；C-E 为 BlueScript II 质粒 DNA 的图象。A-D 采用扫描电镜 (SEM) 沉积的超级针尖，并进行离子研磨；在 A-D 中所观察到的质粒的链宽为 3—6 nm，在 F 中约为 15—20 nm。

微升 DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 滴加到其表面上并吸附 2 min。用 DDW 漂洗除去过量的质粒 DNA 并用氮气吹干；2) 用电子束沉积方法对针尖进行修饰；3) 对成像时湿度进行了系统的研究，找到合适的成像条件。图 3 给出了他们成功地成像质粒 DNA 的若干结果。

Hansma 等在 Vesenka 等的基础上发展了 1 种在液体中成像 DNA 的方法，这种方法使成像 DNA 在丙醇、丁醇或醇-水溶液中进行。结合使用处理过的尖锐 AFM 针尖，可以获得可重复的、高分辨的 DNA 图象。沿着 DNA 的走向可分辨到几个纳米的可重复的特征，接近 DNA 的实际螺旋直径。这是 AFM 在 DNA 研究方面的一个突破，他们所得的一系列 DNA 图象如图 4 所示。

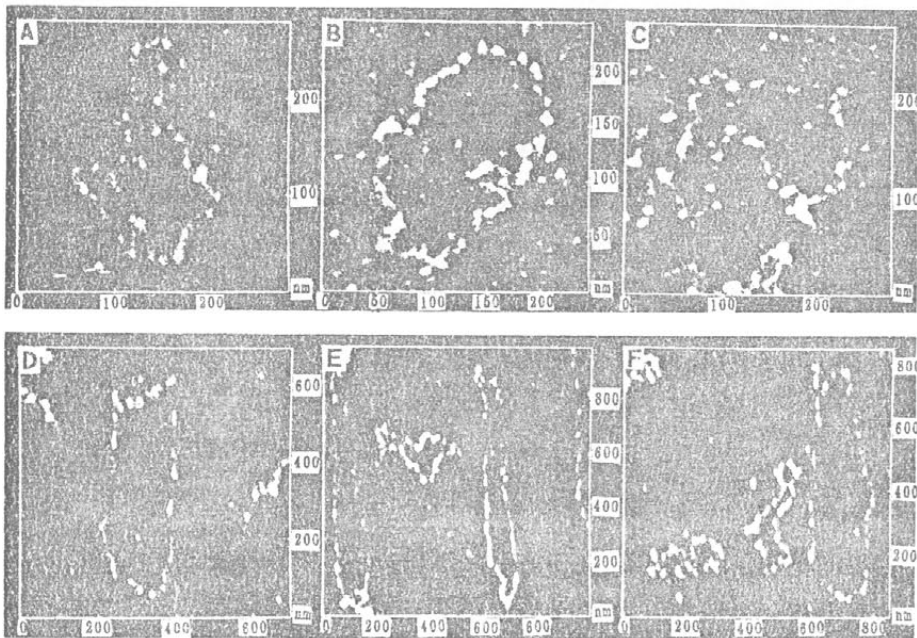


图 5 Φ X 174 单链 DNA 的 AFM 像

Fig. 5 AFM image of Φ X 174 single-chain

实验使用的仪器是 Nanoscope II，A-C 在 1-丙醇中进行，D、E：在 2-丙醇中进行，F：在 1-丁醇中进行。针尖使用离子研磨过 (ion-milled) 的超级针尖

2. 单链 DNA 的成像 由上可知，AFM 用来观察双链 DNA 已经取得了成功。但是，这些制样条件对于单链 DNA 未必适应，Hansma 等成功地找到了用 AFM 成像单

链 DNA 的制样方法 (Hansma 等, 1992)。他们先用类似于 Vesenka 等报道的方法对云母基底进行处理, 所不同的是核酸溶液中含有 0.5% 或 2% 的甲醛。这对于维持单链 DNA 处于伸展状态是关键。用这种方法, 他们成功地用 AFM 观察到环状的 $\Phi X 174$ 单链 DNA, 其结果如图 5 所示。

3. 三链 DNA 的成像 1991 年白春礼等人用 STM 成功地观察到经过变性处理的 λ -噬菌体中的存在的三链 DNA 结构 (白春礼等, 1990)。

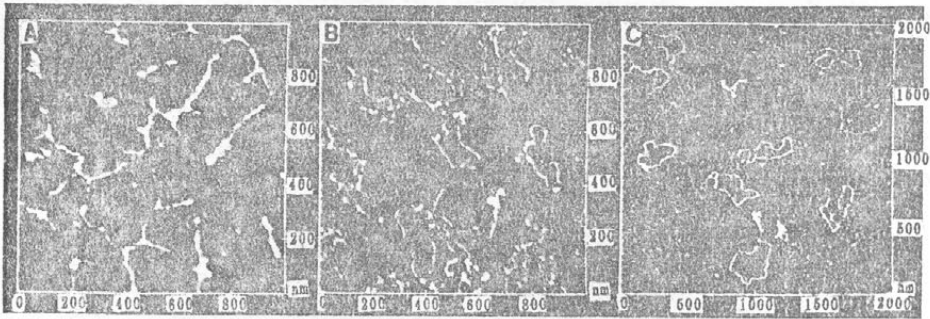


图 6 Bluescript DNA 在 1-丙醇中的 AFM 图象

Fig. 6 AFM image of Bluescript DNA in 1-propanol

A: 为样品未用热水处理的结果; B、C: 为样品经热水处理后的结果

表 1 核酸片段长度的测量

Tab. 1 Measure of DNA fragment length

DNA	计算长度 ^①	实测长度
	(nm)	(nm)
pDL34 ^②	880—1069	1049 ± 52
pVCB5 ^③	823—1000	874 ± 54
pSK31 ^④	930—1130	938 ± 35
fSK14 ^⑤	174—211	93 ± 23
fRB2 ^⑥	144—175	117 ± 37
complex ^⑦	129—156	100 ± 18
fSK16 ^⑧	156—190	169 ± 13
complex ^⑨	130—157	160 ± 23

① 长度按每个碱基对 0.34—0.28 nm 计算 (对于 B→A)。② 在相对湿度为 45% 时 7 个质粒图象的平均值。

③ 在相对湿度为 60% 时 5 个质粒图象的平均值。④ 在相对湿度为 30% 时 8 个质粒图象的平均值。

⑤ 在相对湿度为 30% 时 10 个质粒图象的平均值。⑥ 在相对湿度为 30% 时 9 个质粒图象的平均值。

⑦ 在相对湿度为 30% 时 9 个 RNA_p 的 RB2.5 片段的平均值。

⑧ 在相对湿度为 30% 时 3 个片段图象的平均值。

⑨ 在相对湿度为 30% 时 3 个 RNA_p 的 SK16 片段平均值。

4. 超螺旋 DNA 的成像 类似于透射电镜的结果, 用 AFM 对 DNA 进行观察的许多实验同样表明 DNA 存在超螺旋结构。在 Vesenka 等报道的质粒 DNA 图像中, DNA 呈现特征的超螺旋结构 (如图 3: B 所示)。在 Thundat 等观察到的 pBS+质粒 DNA 结构中, 更呈现明显的超螺旋结构 (如图 2: A, B, D 所示)。Hansma 等用 AFM 也曾观察到质粒 pSK 31 的超螺旋结构 (如图 4: A, C 及图 6: B 所示)。由上可见, AFM 同样是研究 DNA 拓扑结构的有力手段。

5. DNA 片段的成像及长度的测量 AFM 除了用来观察 DNA 的形态外, 它还可用来测量 DNA 的长度。Bustamante(1992)用 AFM 测量 pDL34、pVCB5、pSK31、fSK14、fRB2 及 fSK16 等一系列 DNA 的长度。其结果如表 1 所示。这些数据表明, AFM 可用来测定长度短至 130 nm 的 DNA 片段。

结 论 与 展 望

综上所述, STM 和 AFM 在 DNA 结构研究中的应用, 已从探索性的阶段发展成为可靠地成像 DNA 的方法。在生物材料研究中, 由于导电性等问题, 人们越来越倾向于用 AFM 而不是 STM 作为研究的手段。尤其是制样方法的成功, 使人们能够用 AFM 较容易地成像 DNA 的结构。用 AFM 成像 DNA 的优点是可以在溶液中进行, 并且不用重金属镀膜, 可以直接对 DNA 进行观察。因此, AFM 优于常规的透射电镜方法。AFM 已经被证明在成像石墨、云母等材料上可以达到原子级或接近原子级分辨率, 如果这种能力能够在测定 DNA 的结构方面得以实现, 这对于揭示 DNA 的结构细节, 将具有重大的意义。如果这一步真的实现, 用 AFM 直接对 DNA 进行测序, 将有可能从梦想变为现实, 这对于实施目前举世瞩目的人体基因计划将会带来很大的帮助。

参 考 文 献

- 白春礼, 叶坚, 龚立三等. 1990. 科学通报, 35: 1841—1842.
- 白春礼. 1992. 扫描隧道显微镜及其应用. 上海科学出版社, 91—132.
- Binnig G, Rohrer H, Weibel E. 1982. *Phys. Rev. Lett.* 49: 57—61.
- Bustamante C, Vesenka J, Tang C L *et al.* 1992. *Biochemistry*, 31: 22—26.
- Driscoll R J, Youngquist M G, Baldeschwieler J. 1990. *Nature*, 346: 294—296.
- DeRose J A, Lindsay S M, Nagahara L A *et al.* 1991. *J. Vac. Sci. Technol.*, B9: 1166—1170.
- DeRose J A, Thundat T, Nagahara L A *et al.* 1991. *Surf. Sci.*, 256: 102—108.
- Heckl W M, Kallury K M R, Thompson M. 1989. *Langmuir*, 5: 1433—1435.
- Hausling L, Michel B, Ringsdorf H *et al.* 1991. Direct Observation of Streptavidin Specifically Adsorbed on Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers with the Scanning Tunneling Microscope. *Angew. Chem. Int. Engl.* 30: 567.
- Hansma H G, Vesenka J, Siegerist, Kelderman G *et al.* 1992. *Science*, 256: 1180—1184.
- Hansma H G, Sinsheimer R L, Li M Q *et al.* 1992. *Nucleic Acids Research*, 20: 3585—3590.

- Hansma H G, Gould C, Hansma P K *et al.* 1991. *Langmuir*, **7**: 1051-1054.
- Henderson E, Haydon P G, Sakaguchi D S. 1992. *Science*, **257**: 1944-1946.
- Jericho M H, Nagahara L A, Thundat T *et al.* 1990. *J. Vac. Sci. Technol.*, **A 8**: 655-658.
- Lindsay S M, Nagahara L A, Thundat T *et al.* 1989. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **7**: 289-299.
- Lyubchenko Y L, Lindsay S M, Dekose J A *et al.* 1991. *J. Vac. Sci. Technol.*, **B 9**: 1288-1290.
- Thundat T, Warmack R J, Allison D P *et al.* 1992. *J. Vac. Sci. Tec.*, **A 10**: 630-650.
- Wilson T E, Murray M N, Ogletree D F *et al.* 1991. *J. Vac. Sci. Technol.*, **B 9**: 1171-1176.
- Zenhausern F, Adrian M, Emch R *et al.* 1992. *Ultramicroscopy*, **42-44**: 1168-1172.

Scanning Probe Microscope and Their Application in Study of Nucleic Acid Structure

Zhang Pingcheng Fang Ye Bai Chunli

(*Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080*)

The characteristics of scanning probe microscope (SPM) is given described briefly, comparing with other corresponding techniques (e. q. TEM). The advantages of SPM applied in biology are pointed. Futhermore, a series of method used for solving the problem concerning preparation of biological samples for SPM, such as choice of substrate, fixation of sample, imaging in solution, Hopping technique and modification of tip have been described. Successful applications of SPM, especially atomic force microscope in study of nucleic acid structure are provided here.

Key words: SPM, AFM, DNA, Structure imaging