

Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот

А. П. Лиманский

НИИ иммунологии и микробиологии им. И. И. Мечникова
Ул. Пушкинская, 14, Харьков, 61057, Украина

Arizona State University, Department of Microbiology
Tempe, AZ 85287-2701, USA

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) использована для измерения силы адгезии между зондом и аминомодифицированной (АП) слюдой в водных растворах при различных значениях ионной силы и рН. Показана электростатическая природа сил взаимодействия между зондом АСМ и АП-слюдой, которая может быть матрицей для иммобилизации ДНК.

Введение. Создание сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) в 1986 г. [1] стало этапным событием в области естественных наук подобно открытию ферментов рестрикции и полимеразной цепной реакции в молекулярной биологии. Это открытие привело к появлению нового метода фундаментальных и прикладных исследований — сканирующей зондовой микроскопии.

СТМ является мощным инструментом исследования поверхностных свойств твердых тел и позволяет получать изображение с атомарным разрешением [2]. Для биомолекул и клеток достигнуть такого высокого разрешения с помощью СТМ не удалось ввиду отсутствия метода надежной фиксации биомолекул на графите — субстрате для СТМ, а также их низкой проводимости [3, 4].

С развитием другого направления сканирующей зондовой микроскопии — атомно-силовой микроскопии (АСМ) — был достигнут ощутимый прогресс в исследовании молекул белков, нуклеиновых кислот и их комплексов. Существенным преимуществом АСМ благодаря разработке режима tapping-mode является возможность проведения исследований не только в воздухе, но и в водных растворах. Важным шагом было также создание методики

модификации слюды — субстрата для АСМ, с помощью которой стало реальным получение стабильных изображений молекул ДНК не только в сухом состоянии, но и в буферных растворах [5, 6]. Дальнейшее совершенствование методики модификации субстратов и зондов АСМ привело к формированию целого направления — химической силовой микроскопии (ХСМ, chemical force microscopy) [7, 8]. С помощью ХСМ стало возможным измерение межмолекулярных сил взаимодействия между единичными парами молекул, иммобилизованными на предварительно модифицированных поверхностях зонда и субстрата. Таким образом были измерены силы индивидуального взаимодействия между антигеном и антителом, биотином и стрептовидином, комплементарными нитями ДНК [9, 10].

В данной работе исследована стабильность аминомодифицированной (АП) слюды как субстрата для получения АСМ изображений нуклеиновых кислот. С помощью режима силовых измерений АСМ АП-слюда была охарактеризована посредством измерения силы адгезии между АП-слюдой и немодифицированным Si_3N_4 зондом в водных растворах при различных значениях ионной силы и рН.

Материалы и методы. Атомно-силовая микроскопия. Во всех экспериментах использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope III Multi Mode

System («Digital Instruments», США) с D-сканером и коммерческой жидкостной ячейкой. Зависимости отклонения зонда АСМ от расстояния между зондом и субстратом (в дальнейшем зависимости отклонение зонда—расстояние или сила—расстояние) были записаны с частотой 1—3 Гц и амплитудой 200—400 нм. Графики сила—расстояние были преобразованы из зависимостей отклонение зонда—Z позиция (положение сканера по оси Z) с использованием программного обеспечения Nanoscope III Software v.4.23b15.

Графики отклонение зонда—Z позиция получены посредством стандартной опции калибровки силы (force calibration plot mode) для случайно выбранных точек. Конечные результаты силы адгезии усреднены для 10—30 графиков сила—расстояние. Общее количество силовых кривых, полученных в данной работе, составило 3486. Количество точек, для которых получены данные в одном цикле приближение—удаление (approaching-retracting), составляло 256—512. Все силовые измерения проведены с V-образными кантиливерами из нитрида кремния с золотым напылением (Microlever HWML-06 AU, Park Scientific Instruments, США). Каждый кантиливер содержал шесть Si_3N_4 зондов. Все силовые измерения проведены с зондом E, имеющим константу жесткости $K = 0,1$ – $0,05$ N/m (согласно данным Park Scientific Instruments).

Перед измерениями жидкостная ячейка была промыта бихроматом калия в серной кислоте в течение 5 мин при комнатной температуре и затем интенсивно промыта ультразвуковой водой для удаления возможной контаминации. Для удобства смены буферных растворов при измерении силы взаимодействия между зондом и субстратом в различных ионных условиях к стеклянной ячейке были подсоединены два шприца объемом 2 мл с пластиковыми наконечниками. Стеклянную ячейку использовали без уплотнения. Использованы следующие буферные растворы: 2 мМ трис (гидроксиметил)-аминометан (трис-HCl), pH 7,6, 0,2 мМ ЭДТА (0,2 × ТЕ буфер); 10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 1 мМ ЭДТА (1 × ТЕ буфер); 100 мМ трис-HCl, pH 7,6, 10 мМ ЭДТА (10 × ТЕ буфер); 10 мМ трис, 7 мМ NaOH, pH 11,2; фосфатный буфер с pH 7—9 и ионной силой $I = 10$ мМ; 10 мМ NaOH, pH 12. Значения pH измерены с помощью pH-метра Model 8000 («VWR Scientific Products», Phoenix, США).

Для достижения воспроизводимости графиков сила—расстояние в различных ионных условиях использовали один и тот же зонд для получения набора силовых кривых при различных значениях pH и ионной силы. После осторожного инъецирования в жидкостную ячейку начального буферного

раствора записывали силовые графики при данной ионной силе. Затем стеклянную ячейку осторожно промывали ~ 200 мкл следующего буферного раствора, измеряли силовые кривые для этих ионных условий и так далее. Поскольку известно, что после 10000 силовых циклов силы адгезии между поверхностями зонда и субстрата могут необратимо увеличиваться, серии силовых измерений при различных значениях ионной силы были проведены при скорости приближение/удаление, равной 200—1400 нм/с, частоте $f = 1$ —3 Гц, а их длительность составляла не более 60 мин [11]. АСМ изображения ДНК были записаны с помощью tapping mode АСМ и в воздухе в режиме «Высота» (Height) с использованием обычных, незаостренных зондов фирмы «KTEK International» (Россия) с резонансной частотой 300—360 кГц.

Модификация слюды. Слюду использовали как молекулярно гладкий субстрат для АСМ исследований. Функционализация свежесколотой слюды аминокетонами в парах 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) детально описана ранее [6]. АПТЭС, полученный от «Aldrich» и «United Chemical Technologies, Inc.» (США), очищали посредством вакуумной перегонки в парах Ag. Свежесколотую слюду помещали в стеклянный эксикатор в атмосферу АПТЭС на 1 или 2 ч (АП1- и АП2-слюда соответственно) при комнатных условиях. Модифицированную слюду хранили в эксикаторе в атмосфере аргона.

Приготовление образцов ДНК для АСМ. В работе использовали линейную ДНК фага λ (длина 48502 пары нуклеотидов) фирмы «Promega» (США), а также суперспиральную ДНК плазмиды pUC8 (длина 2665 пар нуклеотидов). Каплю раствора ДНК с концентрацией 0,01—0,1 мкг/мл в ТЕ буфере объемом 7 мкл наносили на полоску модифицированной слюды размером 1 см², а затем сразу промывали деионизированной водой и обдували потоком аргона.

Результаты и обсуждение. Режим силовых измерений контактной АСМ использован для изучения поверхностных свойств АП-слюды. Один цикл силовых измерений состоит из 1) сближения поверхностей зонда и субстрата при перемещении сканера от некоторого заданного положения по Z координате до положения $Z = 0$ и 2) их последующего удаления от положения сканера $Z = 0$ до заданного значения Z. В ходе одного цикла силовых измерений записывали два графика — зависимости отклонения зонда АСМ от Z положения при сближении и удалении поверхностей зонда и субстрата АСМ соответственно. На рис. 1 приведены характерные графики отклонения зонда от Z позиции для АП1

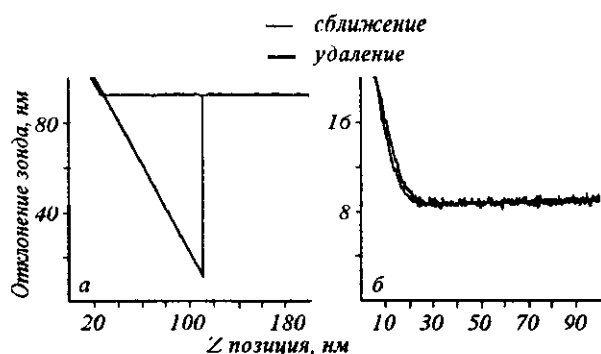


Рис. 1. Зависимости отклонения АСМ зонда от расстояния между зондом и субстратом для пар поверхностей аминомодифицированная слюда— Si_3N_4 зонд (а) и свежесколотая слюда— Si_3N_4 зонд (б). Представлены по две кривые, соответствующие сближению зонда и субстрата с расстояния $Z = 90\text{--}180$ нм до $Z = 0$ нм и последующему их удалению. Величину силы адгезии, отвечающую минимальному отклонению зонда (~ 10 нм для а) на кривой удаления, определяли из графиков сила—расстояние. Графики сила—расстояние получали посредством преобразования графиков отклонение зонда— Z позиция с помощью программного обеспечения Nanoscope III

слюды (а) и немодифицированной свежесколотой слюды (б) в ТЕ буфере при $I = 10$ мМ. Характер обоих силовых графиков указывает на особенности взаимодействующих сил поверхностей зонда и субстрата.

График отклонение зонда— Z позиция преобразовывали в зависимость сила—расстояние с помощью программного обеспечения Nanoscope. Из преобразованных силовых графиков определяли значение силы адгезии как силу разрыва, т. е. силу, необходимую для разведения из контакта поверхностей зонда и субстрата. Для простоты изложения будем понимать под силовыми графиками и зависимости отклонение зонда— Z позиция, и зависимости сила—расстояние. Оси абсцисс в этих силовых графиках отличаются тем, что для графика сила—расстояние поверхности зонда и субстрата находятся в контакте при расстоянии $Z = 0$, а для графика отклонение зонда— Z позиция их поверхности «прыгают в контакт» при значении Z положения сканера, отличном от нуля. При этом дальнейшее движение сканера означает, что зонд «вдавливается» в субстрат до позиции сканера $Z = 0$. Для пары поверхностей свежесколотая слюда— Si_3N_4 зонд силовые кривые сближения и удаления практически совпадают (рис. 1, б). При этом форма

силовой кривой сближения перед «прыжком в контакт» двух поверхностей указывает на электростатическую природу взаимодействующих сил. Характерный загиб силовых кривых сближения свежесколотой слюды и Si_3N_4 зонда указывает на отталкивание их поверхностей в неконтактной области и, следовательно, зонд и субстрат имеют суммарные поверхностные заряды одинакового знака. В водном растворе электролита АСМ зонд и субстрат имеют поверхностные заряды в соответствии с их множественными изоэлектрическими точками. Величина и знак заряда зависят от температуры и рН раствора, а также от состава поверхностей. Поскольку слюда отрицательно заряжена во всем диапазоне рН [12], отталкивание в неконтактной области силовой кривой сближения подтверждает тот факт, что Si_3N_4 зонд отрицательно заряжен в ТЕ буфере при рН 7,6.

Рассчитанные с помощью программного обеспечения Kaleda Graph силы адгезии для АП1- и АП2-слюды в водных растворах при различных значениях ионной силы и рН для трех различных кантиливеров приведены в таблице.

Посредством потенциометрического титрования нами было определено, что константа ионизации аминокрупп АПТЭС в водном растворе составляет $pK \sim 10$. В то же время следует принять во внимание, что значения pK аминокрупп поверхностей с самоассоциированными монослоями (САМ) ниже на 3—6 единиц по сравнению с аминокруппа-

Сила адгезии для аминомодифицированной (АП) слюды и немодифицированных кантиливеров при различных ионных условиях

Кантиливер	10 мМ трис-НСl, рН 7,6	100 мМ трис-НСl, рН 7,6	рН 11,2
<i>АП1-слюда</i>			
1	$1,96 \pm 0,40$	$0,84 \pm 0,09$	$0,78 \pm 0,15$
2	$4,62 \pm 0,47$	$2,28 \pm 0,28$	$1,08 \pm 0,36$
3	$1,75 \pm 0,19$	$1,24 \pm 0,19$	$0,55 \pm 0,13$
<i>АП2-слюда</i>			
1	—	—	—
2	$6,57 \pm 1,37$	$2,32 \pm 0,36$	$2,24 \pm 1,08$
3	$1,37 \pm 0,25$	$1,54 \pm 0,32$	$1,14 \pm 0,21$

Примечание. «—» — Измерений не проводили.

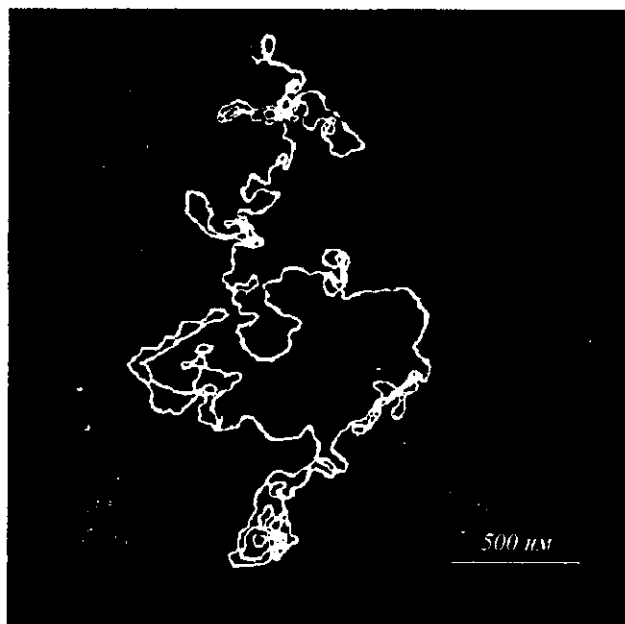


Рис. 2. Изображение ДНК фага λ , полученное нанесением раствора ДНК на аминომодифицированную слюду (АП-1) с помощью атомно-силового микроскопа. Размер кадра $2,6 \times 2,6$ мкм

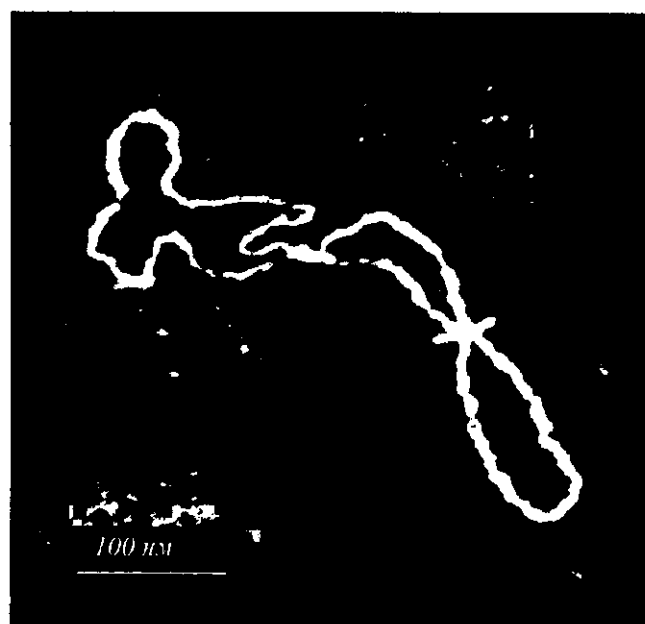


Рис. 3. Изображение суперспиральной ДНК плазмиды *rUC8*, полученное с помощью АСМ на аминомодифицированную слюду (АП-1). Размер кадра 372×372 нм

ми в растворе [7, 13]. Следовательно, аминокруппы, покрывающие поверхность слюды после модификации с помощью АПТЭС, должны быть положительно заряжены при рН 7,6. Это приводит к адгезивному эффекту между положительно заряженной АП-слюдой и отрицательно заряженным зондом при низкой ионной силе (рис. 1, а) благодаря электростатическому взаимодействию между аминокруппами модифицированной слюды и поверхностью зонда.

Данные, приведенные в таблице, показывают, что сила адгезии между АП-слюдой и зондом уменьшается в 1,5—2,8 раза при увеличении ионной силы в 10 раз с последующим еще более значительным экранированием заряда аминокрупп при рН 11,2. На силовых графиках сближения при рН 11,2 можно наблюдать отталкивание в неконтактной области между АП-слюдой и зондом: дальнедействующее электростатическое отталкивание становится значительным, в то время как силы адгезии существенно меньше, чем при нейтральных рН.

Неспецифическое взаимодействие зонд—слюда в водном растворе может быть моделировано электростатическими и ван-дер-ваальсовыми (VdW) силами [14]. Поскольку VdW силы не зависят от рН

[12], основной вклад в уменьшение силы адгезии для пары АП-слюда—зонд при изменении рН вносят электростатические силы.

Наши данные хорошо согласуются с результатами работы [15] по изучению таких же аминомодифицированных поверхностей, однако противоречат данным по потенциометрическому титрованию пар одинаковых аминокповерхностей [7, 12]. Однако непосредственное сравнение величин сил адгезии для различных кантиливеров, а также сопоставление их с данными других авторов осложнено, по крайней мере, несколькими причинами: 1) зонды из нитрида кремния могут иметь различный состав и толщину окисного слоя, диаметр острия; 2) поскольку процедуры модификации с помощью АПТЭС отличаются, то это может приводить к образованию САМ с различной поверхностной плотностью аминов, гидрофобными и сольватационными свойствами АП-поверхностей; 3) знак заряда поверхности зонда может меняться на противоположный как функция ионной силы в диапазоне рН 6—8,5. Все вышперечисленные пункты могут вызывать разброс значений сил адгезии. Таким образом, интерпретация различий в силе адгезии для различных кантиливеров затруднительна, поскольку существует значительный разброс разме-

ров радиуса закругления зонда, а также плотности заряда различных участков АП-слоюды после модификации с АПТЭС.

АП-слоюда была использована как субстрат для получения АСМ изображений нуклеиновых кислот. На рис. 2 и 3 приведены два типичных АСМ изображения единичных молекул линейной ДНК фага λ и суперспиральной ДНК плазмиды *pUC8* на АП1-слоюде. Методика приготовления образца ДНК на АП-слоюде обеспечивает сильное связывание молекул ДНК с субстратом. Для приготовления одного образца ДНК для АСМ необходимо 3—4 мин. Приготовленные таким образом образцы ДНК могут храниться в течение нескольких месяцев без заметного ухудшения АСМ изображения при повторном сканировании. Большинство молекул ДНК на АП-слоюде имеет сглаженные очертания, без резких изгибов. В то же время изображения ДНК, полученные на АП2-слоюде (данные не приведены), характеризуются своеобразными кинками, резкими изгибами. Мы предположили, что одной из возможных причин различия качества АСМ изображений ДНК на АП-слоюде является различная поверхностная плотность заряда АП1- и АП2-слоюды. Наши предварительные результаты исследований структуры ДНК при различной ионной силе и pH показывают, что взаимодействие между АП-поверхностью слюды и зондом может быть объяснено суперпозицией электростатических и VdW сил, а также возможным образованием водородных связей между силанольными группами зонда и аминокруппами АП-слоюды.

Выводы. Атомно-силовая микроскопия в режиме силовых измерений была использована для изучения поверхностных свойств субстратов для иммобилизации биомолекул. Анализ профилей силовых кривых позволяет прояснить природу сил взаимодействующих поверхностей, а также количественно охарактеризовать межмолекулярные силы взаимодействия. Приведенные данные показывают, что электростатические силы являются доминирующими при взаимодействии АП-слоюды и АСМ зонда из нитрида силикона. Дополнительная информация может быть получена из экспериментов по измерению работы силы адгезии модифицированных поверхностей. Варьирование условий модификации слюды дает возможность получать модифицированную слюду с заданными свойствами, служащую субстратом при получении АСМ как линейных, так и суперспиральных молекул ДНК. Простая процедура приготовления образца является существенным преимуществом АСМ по сравнению со стандартной электронной микроскопией. Кроме того, стабильное связывание молекул ДНК с субстратом

позволяет проводить структурные исследования нуклеиновых кислот и их комплексов с белками в водных растворах.

Данная работа поддержана грантом GM54991 Национального института здоровья (НИН, США).

A. P. Limansky

Investigation of aminomodified mica as a substrate for nucleic acids atomic force microscopy

Summary

Adhesion forces for aminomodified (AP) mica in aqueous solutions at different ionic strength (I) and pH were determined by atomic force microscopy (AFM). Adhesion force values have been decreased in direction $I = 10 \text{ mM} \rightarrow I = 100 \text{ mM} \rightarrow \text{pH } 11.2$ for pair tip — AP-mica which was modified with 3-aminopropyltriethoxy silane (APTES) vapour. Stability of AP-mica surface was estimated by AFM imaging of linear DNA λ and supercoiled plasmid DNA pUC8 immobilized at AP-mica. Best DNA images were received at AP1 mica, i. e. after mica modification with APTES vapour in 1 hour.

О. П. Лиманский

Дослідження аміномодифікованої слюди як субстрату для атомно-силової мікроскопії нуклеїнових кислот

Резюме

Визначено сили адгезії аміномодифікованої (АП) слюди у водних розчинах за різних значень іонної сили (I) та pH за допомогою атомно-силової мікроскопії у режимі силових вимірювань. Значення сил адгезії для пари зонд—АП-слоюда, отриманої модифікацією у парах 3-амінопропілтриетоксисилана (АПТЕС), зменшувалися в ряду $I = 10 \text{ mM} \rightarrow I = 100 \text{ mM} \rightarrow \text{pH } 11,2$. Стабільність АП-поверхні як матриці для зв'язування біомолекул було оцінено за допомогою якості АСМ зображень у повітрі лінійної ДНК фага λ та суперспіральної ДНК плазмиди pUC8, іммобілізованих на АП-слоюді. Найкращі зображення ДНК було отримано на АП1-слоюді, тобто при модифікації слюди у парах АПТЕС протягом 1 год.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Binnig G., Quate C. F., Gerber Ch. Atomic force microscope // *Phys. Rev. Lett.*—1986.—56, N 9.—P. 930—933.
2. Grigoryan L. S., Narlikar A. V., Samantha S. B. Scanning tunneling microscopy imaging of C60 molecules // *Fullerenes. Recent advances in the chemistry and physics of fullerenes and related materials* / Eds K. Kadish, R. Ruoff.—Pennington: The Electrochemical Society Inc., 1994.—P. 1691—1703.
3. Lyubchenko Y., Lindsay S. M., De Rose J., Thundat T. A technique for stable adhesion of DNA to a modified graphite surface for imaging by scanning tunneling microscopy // *J. Vac. Sci. Technol.*—1991.—B9, N 2.—P. 1288—1290.
4. Kamensky Yu. V., Limanskaya O. Yu., Limansky A. P. Imaging of oligonucleotides and DNA by scanning tunneling microscopy // *Second Int. Conf. on Nanometer Scale Science and Technology (Moscow, August 2—6, 1993)*.—Moscow, 1993.—P. 128.
5. Shlyakhtenko L., Gall A., Weimer J., Hawn D., Lyubchenko Y. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate // *Biophys. J.*—1999.—77.—P. 568—576.
6. Lyubchenko Y., Jacobs B., Lindsay S. Atomic force microscopy

- of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurement // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 15.—P. 3983—3986.
7. *Vezenov D., Noy A., Rozsnyai L., Lieber C.* Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy // *J. Amer. Chem. Soc.*—1997.—119.—P. 2006—2015.
 8. *Frisbie C., Rozsnyai L., Noy A., Wrighton M., Lieber C.* Functional group imaging by chemical force microscopy // *Science.*—1994.—265.—P. 2071—2074.
 9. *Moy V., Florin E.-L., Gaub H.* Intermolecular forces and energies between ligands and receptors // *Science.*—1994.—266.—P. 257—259.
 10. *Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H., Schilcher K., Schindler H.* Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 3477—3481.
 11. *Hazel J., Tsukruk V.* Spring constants of composite ceramic/gold cantilevers for scanning probe microscopy // *Thin Solid Films.*—1999.—339.—P. 249—257.
 12. *Butt H.* Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope // *Biophys. J.*—1991.—60.—P. 1438—1444.
 13. *Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z.* Force titration of amino group — terminated self-assembled monolayers using chemical force microscopy // *Appl. Phys.*—1998.—A66.—P. S269—S271.
 14. *Willemsen G. O., Snel M., Kuipers L., Figdor C., Greve J., Grooth B.* A physical approach to reduce nonspecific adhesion in molecular recognition atomic force microscopy // *Biophys. J.*—1999.—76.—P. 716—724.
 15. *Tsukruk V., Bliznyuk V.* Adhesive and friction forces between chemically modified silicon and silicon nitride surfaces // *Langmuir.*—1998.—14.—P. 446—455.

УДК 678.046.365:577.323
Надійшла до редакції 04.04.2000